

Dissertation

“Etablierung eines neuartigen Systems zur Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln als Träger für Fremdsequenzen”

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von Diplom-Biochemiker Hassen Siraj

geb. am 11. Juni 1969 in Addis Abeba

Präsident der

Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h. c. Hans Meyer

Dekan der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Jürgen Rabe

Gutachter:

1. Prof. Dr. Med. Detlev Krüger

2. Prof. Dr. Siegfried Scherneck

3. Prof. Dr. Richard Lucius

Einreichungsdatum

Dezember den 18.12.1999

Tag der mündlichen Prüfung:

Mittwoch den 21.06.2000

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Moderne Strategien der Vakzineentwicklung	1
1.1.1. Rekombinante Proteine als Vakzine	1
1.1.2. Virus-ähnliche Partikel als neuartige Impfstoffe	2
1.1.3. Virus-ähnliche Partikel als Träger für fremde Epitope	3
1.1.4. Bestimmung potentieller Insertionsorte für Fremdproteinsegmente in VLP-Trägermolekülen durch Epitopkartierung	4
1.2. Polyomavirus-ähnliche Partikel als potentielle Vehikel für die Gentherapie	5
1.2.1. Genomorganisation der Polyomaviren	5
1.2.2. Frühe Proteine der Polyomaviren	6
1.2.3. Strukturproteine der Polyomaviren	7
1.2.4. Das Hamster-Polyomavirus	8
1.2.5. Polyomavirus-abgeleitete Partikel als Transportersysteme in der Gentherapie	10
1.3. Zielstellung der Arbeit	11
2. MATERIALIEN UND METHODEN	12
2.1. Biologische Materialien	12
2.1.1. Tumorgewebe	12
2.1.2. Lebergewebe	12
2.1.3. Verwendete Plasmide	12
2.1.4. Bakterienstämme	13
2.1.5. Insektenzellen	13
2.1.6. Hamsterseren	13
2.1.7. Monospezifische Kaninchen-anti-VP1-Seren	15
2.1.8. Enzyme	15
2.1.9. DNA-Molekulargewichtsmarker	15
2.1.10. LMW Electrophoresis Calibration kit (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)	15
2.2. Methoden zur Virusisolierung und Gewebeaufarbeitung	16
2.2.1. Reinigung von HaPV-Virionen (nach Böttger et al., 1971, modifiziert)	16
2.2.2. Herstellung von Lebergewebsproben	16
2.3. Methoden der DNA-Isolierung und –Reinigung	16
2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA	16
2.3.1.1. Mini-Präparation durch alkalische Lyse	16
2.3.1.2. Plasmid-Midipräparation durch Säulen-Chromatographie	17
2.3.2. Reinigung und Präzipitation von DNA	17
2.3.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion	17
2.3.2.2. Ethanolpräzipitation	17
2.3.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	17
2.3.3. DNA-Klonierung	18
2.3.3.1. Restriktionsendonukleasespaltung	18
2.3.3.2. Analytische Agarosegelelektrophorese	18
2.3.3.3. Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Fragment-Isolation	18

2.3.3.4. Dephospholierung der Vektor-DNA	18
2.3.3.5. Ligation	19
2.3.3.6. Herstellung kompetenter Zellen	19
2.3.3.7. Transformation	20
2.3.3.8. Charakterisierung der rekombinanten Klone	20
2.3.4. Arbeiten mit Zellkulturen	20
2.3.4.1. Kultivierung der Insektenzellen	20
2.3.4.2. Cotransfektion von Insektenzellen	21
2.3.4.3. Plaquereinigung rekombinanter Baculoviren	21
2.3.4.4. Virusvermehrung	22
2.3.5. Expression des HaPV-VP1 in E. coli	22
2.3.5.1. Synthese von rekombinanten VP1-Proteinen mittels pQE-Vektoren	22
2.3.5.2. Lyse der Bakterienzellen	23
2.3.6. Proteinanalytik	23
2.3.6.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.3.6.2. Western Blot-Analyse	23
2.3.6.3. Coomassieblau-Färbung	24
2.3.6.4. Elektronenmikroskopie	25
2.3.6.5. N-terminale Sequenzierung des viralen VP1	25
2.3.7. Charakterisierung der Baculovirus-exprimierten VP1-Derivate	25
2.3.7.1. Reinigung der rekombinanten Proteine durch Gradientenzentrifugation	25
2.3.7.2. Untersuchung der DNA-Kontamination von VP1-Partikeln	26
2.3.7.3. Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Baculovirus-exprimierten VP1-Derivate	26
2.3.7.3.1. mittels Zellfraktionierung	26
2.3.7.3.2. mittels Elektronenmikroskopie	27
2.3.7.4. Stabilität von VP1-abgeleiteten Partikeln	27
2.3.7.5. Quantitative Proteinbestimmung	27
3. ERGEBNISSE	28
3.1. Charakterisierung des Kapsids des Hamsterpolyomavirus	28
3.1.1. Reinigung und elektronenmikroskopische Charakterisierung des Hamsterpolyomavirus	28
3.1.2. Analyse der Proteinzusammensetzung des HaPV-Kapsids	29
3.1.3. Bestimmung der N-terminalen Sequenz des viralen VP1	30
3.1.4. Aminosäurehomologie der Kapsidproteine von HaPV zu denen anderer Polyomaviren	31
3.1.5. Immunologische Reaktivität der HaPV-Proteine mit Seren von HaPV-infizierten Hamstern	32
3.2. Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln auf der Basis des VP1 vom HaPV	33
3.2.1. Klonierung der kodierenden Sequenzen für das authentische und ein N-terminal verlängertes VP1 des HaPV in pBacPak9	33
3.2.2. Expression und Antigenität des HaPV-VP1 aus Insektenzellen	34
3.2.3. Nachweis der Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln in Insektenzellen	37
3.2.4. Untersuchungen zur Stabilität und zu einer möglichen Kontamination der Virus-ähnlichen Partikel mit Nukleinsäure	37
3.2.5. Kreuzreaktivität der Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1-Derivate mit gegen andere Polyomaviren gerichteten Antiseren	39
3.2.6. Subzelluläre Lokalisation des Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1 in Insektenzellen	41
3.2.6.1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation	41
3.2.6.2. Zellfraktionierung zum Nachweis der subzellulären Lokalisation	43
3.3. Ermittlung potentieller Insertionsorte für Fremdsequenzen im HaPV-VP1 durch Epitopmapping	44
3.3.1. Kartierung von Epitopen mit Hilfe rekombinanter HaPV-VP1-Proteine	44
3.3.1.1. Subklonierung der HaPV-VP1-kodierenden Fragmente in pQE-Vektoren	44
3.3.1.2. Expression rekombinanter HaPV-Proteine in E. coli	45
3.3.1.3. Epitopmapping im VP1 des HaPV mit Hilfe der rekombinanten Fusionsproteine	47
3.3.1.3.1. Die Reaktivität der rekombinanten Proteine mit HaPV-VP1-spezifischen Kaninchenserum	47
3.3.1.3.2. Die Reaktivität der rekombinanten Proteine mit Seren von HaPV-infizierten Z3-Hamstern	48
3.3.1.3.3. Kartierung einer kreuzreaktiven Region des Polyomavirus-VP1	50

3.3.2. Epitopmapping im VP1 des HaPV mit Hilfe von synthetischen Peptiden	50
3.3.2.1. Reaktivität der synthetischen Peptide mit Kaninchen anti-HaPV-VP1-Serum	51
3.3.2.2. Reaktivität der synthetischen Peptide mit Serumpools von HaPV-infizierten Z3- Hamstern	51
3.3.2.3. Kartierung kreuzreaktiver Epitope im HaPV-VP1	53
4. DISKUSSION	55
4.1. Struktur und Proteinzusammensetzung des HaPV-Kapsids	55
4.2. Virus-ähnliche Partikel auf der Basis des HaPV-VP1	56
4.2.1. Die Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln in Insektenzellen	56
4.2.2. Subzelluläre Lokalisation des VP1-Proteins in Insektenzellen	58
4.2.3. Stabilität der Virus-ähnlichen Partikel	62
4.2.4. Die Untersuchung der Nukleinsäure-Kontamination von HaPV-VP1-Partikeln	64
4.3 Epitopmapping zur Ermittlung potentieller Insertionsorte für Fremdsequenzen im VP1 von HaPV	65
4.4. Ausblick	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcNPV	Autographa californica nuclear polyhedrosis virus
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BKV	menschliches Polyomavirus BK
bp	Basenpaar(e)
BFDV	Virus der Nestlingskrankheit der Wellensittiche
BSA	bovines Serumalbumin
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-N,N-tetraacetat
FKS	fetales Kälberserum
frCP	Hüllprotein des Bakteriophagen fr
GET	Glukose-EDTA-Tris-Puffer
HBcAg	Coreantigen des Hepatitis B Virus
HBsAg	Oberflächenprotein des Hepatitis B Virus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
JCV	menschliches Polyomavirus JCV
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

KLS	Kernlokalisierungssignal
lac	Laktose-Operon
LPV	B-Zell-lymphotropes Affenpolyomavirus
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
min	Minute
moi	Infektionsmultiplizität
NP-40	Nonidet P-40
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
p.i.	nach Infektion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PCR	Polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit (plaquebildende Einheit)
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
Tab	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TE-puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit für die Aktivität eines Enzyms
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VP	Virusprotein
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Zusammenfassung

Das Hamsterpolyomavirus (HaPV) wurde aus Hauttumoren von HaPV-infizierten Hamstern isoliert und gereinigt. Die Virionen sind ca. 45 nm groß und sind durch einen Polyomavirus-typischen ikosaedrischen Aufbau gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den Kapsiden anderer Polyomaviren zeigen sie jedoch eine T=7-laevo Symmetrie.

Die Analyse der Proteinzusammensetzung zeigte, daß das HaPV-Kapsid hauptsächlich aus drei Virus-kodierten Strukturproteinen (VP1, VP2 und VP3) besteht. Das VP1 repräsentiert ca. 71% des Gesamtkapsidproteins und stellt somit das Hauptkapsidprotein dar. Die Vorhersage des VP1-ORF ergab 2 in-frame befindliche potentielle Translationsinitiationssignale (ATG), die zur Synthese von VP1-abgeleiteten Proteinen von 384 und 388 Aminosäuren führen sollten. Die Sequenzierung des N-Terminus des viralen VP1 ergab, daß die Translationsinitiation am 2. ATG des VP1-ORF erfolgt, so daß das authentische VP1 384 Aminosäuren beinhaltet (MG: ca. 41,8 kDa).

Das authentische und das N-terminal verlängerte VP1 wurden in Insektenzellen zur Expression gebracht. Die Proteine reagierten im Western blot mit HaPV-VP1-spezifischen Kaninchenseren und Seren von HaPV-infizierten Hamstern. Beide VP1-Derivate sind in der Lage, in Insektenzellen Virus-ähnliche Partikel zu bilden. Diese Partikel ähneln in ihrer Dichte und Struktur leeren HaPV-Virionen. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und Zellfraktionierung konnte die nukleare Lokalisation der Partikel in Insektenzellen gezeigt werden. Durch Behandlung der Partikel mit EGTA/DTT lassen sich die Partikel in Pentamere dissoziieren. Möglicherweise können die Partikel durch Dissoziation und anschließende Reassoziierung mit fremder Nukleinsäure beladen werden, um für gentherapeutische Anwendungen eingesetzt zu werden.

Zur Ermittlung potentieller Insertionsorte für Fremdsequenzen im VP1 wurde die dreidimensionale Struktur des HaPV-VP1 auf der Basis verwandter Polyomaviren vorhergesagt und eine Epitopkartierung mit Hilfe in *E. coli* exprimierter rekombinanter VP1-Derivate und synthetischer Peptide durchgeführt. Die Vorhersage der Struktur ergab 5 oberflächenexponierte Regionen: As 81-88, As 222/223, As 244-246, As 289-294 und die C-terminale Region von VP1. Zwei der genannten Regionen (As 79-97 und die C-terminale Region von VP1) konnten bei beiden Epitopkartierungsstudien als Epitope identifiziert werden. Wahrscheinlich sind in der C-terminalen Region (As 320-384) sowohl lineare als auch mindestens ein diskontinuierliches Epitop lokalisiert. Diese Region ist auch die Ursache für die Kreuzreaktivität von HaPV-VP1 mit anti-SV40- und anti-JCV-positiven Seren. Aufgrund der wichtigen Funktion der C-terminalen Region beim Virus-Assembly kann diese Region wahrscheinlich nicht als Insertionsort für Fremdsequenzen verwendet werden, während die Region As 84-87 für die Insertion von Fremdproteinsequenzen geeignet sein sollte.

Summary

Hamster polyomavirus (HaPV) particles were isolated and purified from the skin tumors of hamster polyomavirus infected hamsters. Virions were found to be approximately 45 nm in diameter. They demonstrate the typical icosahedral structure of polyomaviruses. However, in contrast to other polyomavirus capsids, they demonstrate a T=7-laevo symmetry.

The analysis of the protein composition of the virus capsid showed that it is made up of mainly three virus-coded structural proteins VP1, VP2 and VP3. The VP1 represents up about 71% of the protein mass found in the virion and is therefore the major capsid protein. The prediction of the VP1-ORF showed the existence of 2 in-frame ATG codons which should result in the synthesis of VP1 proteins of 384 or 388 amino acids. The determination of the N-terminal amino acid sequence of the virion-derived VP1 by the method of Edman degradation revealed that the second ATG codon is the initiation site for translation. Therefore the authentic VP1 contains 384 amino acid residues (m.w. 41.8 kDa).

The authentic VP1 and its N-terminal prolonged derivative were expressed in insect cells. The VP1 proteins reacted in the Western blot with HaPV-VP1-specific rabbit sera and sera of HaPV-infected hamsters. Both VP1 derivatives were able to form virus-like particles. In their density and morphology they are similar to empty HaPV virions. Electronmicroscopic investigations and cell fractionation experiments demonstrated the nuclear localization of the particles in insect cells. The treatment of particles with EGTA/DTT resulted in their dissociation in pentameric subunits. For use in gene therapy particles can be probably loaded with foreign nucleic acids by dissociation and subsequent reassociation.

In order to find out potential insertion sites for foreign sequences in VP1, the three-dimensional structure of HaPV-VP1 was predicted on the basis of the known X-ray structure of related polyomaviruses. In addition, epitopes within VP1 were mapped by means of truncated recombinant VP1 derivatives and synthetic peptides. According to structure modelling 5 surface-exposed regions exist in the HaPV-VP1: As 81-88, 222/223, 244-246, 289-294 and the C- terminal region. By epitope mapping we could show that at 2 out of these 5 regions in VP1, namely at As 79-97 and at the C-terminal part of HaPV-VP1, antigenic determinants are located. Most likely, in the C-terminal region (As 320-384) linear as well as at least one discontinuous epitope exist. This region is also responsible for the cross-reactivity of HaPV-VP1 with anti-SV40 and anti-JCV-VP1-specific sera. Because of its important function in virus Assembly, the C-terminal part of HaPV-VP1 is not allowed to be used as insertion site for foreign sequences. According to the structural predictions and epitope mapping data the region As 84-87 should allow the insertion of foreign protein segments.

1. Einleitung

1.1. Moderne Strategien der Vakzineentwicklung

1.1.1. Rekombinante Proteine als Vakzine

Impfungen gegen Infektionskrankheiten haben eine lange Tradition, weit länger als unsere Kenntnis der entsprechenden Krankheitserreger. Zur Bekämpfung der Infektionskrankheiten werden verschiedene Arten von Vakzinen verwendet.

Attenuierte Lebendvakzinen enthalten replikationsfähige Erreger, die sich in der geimpften Person vermehren können. Im Vergleich zum jeweiligen Wildtypvirus verursachen sie jedoch eine begrenzte oder abgeschwächte Infektion. Aufgrund der intrazellulären Replikation induzieren Lebendvakzinen sowohl neutralisierende Antikörper als auch cytotoxische T-Lymphocyten. Die meisten Lebendvakzinen wurden durch Adaptierung eines Wildtyp-Virusstammes an einen neuen Wirt (meist in der Zellkultur) entwickelt. Leider replizieren manche humanpathogene Viren, darunter der Erreger der Hepatitis B und Papillomviren, nicht in der Zellkultur. Desweiteren besteht bei der Verwendung attenuierter Viren das Risiko, daß sie im Verlauf der abgeschwächten Infektion zum Wildtyp rückmutieren (Brennan et al., 1999).

Bei inaktivierten Vakzinen, sogenannten Totimpfstoffen, erfolgt nach Applikation keine Virusvermehrung. Sie werden durch Inaktivierung der Infektiosität bei Behandlung mit bestimmten Chemikalien hergestellt und induzieren überwiegend Antikörperreaktionen. Die Ausbildung einer cytotoxischen T-Zellantwort ist aufgrund des Ausbleibens einer aktiven Proteinsynthese selten.

Mit der Entwicklung der Gentechnik ist es möglich geworden, rekombinante Vakzinen in großen Mengen biotechnologisch herzustellen und dabei deren Risikopotential dramatisch zu verringern. Rekombinante Proteine können durch heterologe Expression von viralen Proteinen in Bakterien, Hefen, Insekten- und Säugerzellen und in transgenen Pflanzen hergestellt werden (Ulrich et al., 1998). Für eine Vielzahl viraler Erreger konnte gezeigt werden, daß rekombinante Proteine in der Lage sind, nicht nur eine cytotoxische T-Zell-Antwort und / oder eine Antikörperantwort zu induzieren, sondern auch Tiere vor einem nachfolgenden Viruschallenge zu schützen. So war ein in *Salmonella* exprimiertes Influenza-Nukleoprotein in der Lage, eine cytotoxische Immunantwort zu induzieren (Gao et al., 1992). In Insektenzellen exprimierte Oberflächenproteine des Cytomegalievirus führten in der Maus zur Bildung von Virus- neutralisierenden Antikörpern und Virus-spezifischen cytotoxischen T-Zellen (Britt et al., 1995). Im Rind und anderen Versuchstieren konnte durch Immunisierung mit einem

Fusionsprotein aus β -Galaktosidase und VP1 des Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV) die Bildung Virus-neutralisierender Antikörper induziert werden (Broekhuijsen et al., 1987). Agterberg et al. (1990) konnten zeigen, daß ein chimäres Fusionsprotein aus PhoE und FMDV-VP1 in der Lage ist, Schweine vor einer tödlichen FMDV-Infektion zu schützen. Die rekombinanten Proteine aus Nukleoprotein und Glycoprotein-2 des lymphocytären Choriomeningitisvirus können Mäuse vor einer letalen lymphocytären Choriomeningitisvirus Infektion schützen (Weidet et al., 1994).

Bis heute ist eine große Anzahl verschiedener viraler Vektoren für die Konstruktion von rekombinanten Lebendvakzinen und für die eukaryontische Expression von Virusantigenen eingesetzt worden. Als virale Expressionssysteme sind Vakzinia-Virus-, Adenovirus-, Herpes-simplex-Virus- und Papovavirus-abgeleitete virale Vektoren verwendet worden (Perkas et al., 1996). Ein rekombinantes Vakzinia-Virus, das das Glycoprotein des Tollwutvirus exprimiert, ist als Lebendvakzine erfolgreich bei der Eliminierung der Fuchstollwut in Belgien eingesetzt worden (Brochier et al., 1994). Das Oberflächenprotein VP1 des Maul- und Klauenseuche-Virus, das im Picornavirus-Expressionssystem exprimiert wurde, ist in der Lage, Schweine vor einer tödlichen FMDV-Dosis zu schützen (Reider et al., 1994). Die mit Hilfe viraler Vektoren exprimierten und gereinigten Hüllproteine des SIV (gp160) schützten die immunisierten Tiere gegen eine nachfolgende SIV-Infektion (Hu et al., 1992). Allerdings sind solche rekombinanten Proteine allein gering immunogen und müssen in der Regel mit Adjuvantien appliziert werden.

1.1.2. Virus-ähnliche Partikel als neuartige Impfstoffe

Für eine Reihe von viralen Kapsid- und Hüllproteinen konnte gezeigt werden, daß sie sich in heterologen Wirtszellen spontan zu Partikeln zusammenlagern, die sich strukturell und in ihren immunologischen Eigenschaften nicht oder nur gering von den authentischen Viren unterscheiden (Ulrich et al., 1998). Deshalb werden diese multimeren Aggregate als Virus-ähnliche Partikel (VLPs) bezeichnet. Für die Bildung solcher VLPs sind weder weitere virale Proteine noch virale Nukleinsäure notwendig. Damit bieten VLPs den Vorteil, daß sie nicht infektiös sind. VLPs sind aufgrund ihrer multimeren Struktur und des Vorhandenseins von T- Helfer-Zell-Epitopen (T_H) hochimmunogen (Ulrich et al., 1998). Außerdem werden beim Assembly von Partikeln durch Wechselwirkung der einzelnen Protein-Untereinheiten konformationsabhängige Epitope ausgeprägt. Solche Epitope führen oft zur Induktion einer Immunantwort, die die Infektiosität des Virus neutralisieren kann (Ulrich et al., 1998). Verschiedene VLPs sind auch in der Lage, eine cytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren (Schirmbeck et al., 1994 und 1996; Layton et al., 1993).

So basiert der erste, auf gentechnischem Weg hergestellte und lizenzierte Impfstoff auf in Hefe exprimierten, HBsAg-abgeleiteten VLPs (Schirmbeck et al., 1994). Partikelbildende Strukturproteine

von Papillom- und Rotaviren werden gegenwärtig auf ihre Eignung als Vakzine untersucht (Ellis et al., 1996). So konnten im Tiermodell nach Immunisierung mit in Insektenzellen exprimierter VLPs des Kapsidproteins L1 eines menschlichen Papillomvirus Virus-neutralisierende Antikörper induziert werden (Christensen et al., 1994). Breitbrud et al., (1995) konnten zeigen, daß heterolog exprimierte VLPs des Kaninchen-Papillomvirus in der Lage sind, Kaninchen vor einer tödlichen Virusinfektion zu schützen. VLPs auf der Basis eines in Insektenzellen synthetisierten Kapsidproteins des Rotavirus schützten Mäuse vor einer Virusinfektion (O'Neal et al., 1997). Für eine Reihe weiterer VLPs konnte die Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern und zum Teil einer protektiven Immunantwort in Tiermodellen gezeigt werden. Marmosetten konnten durch Immunisierung mit VLPs, die durch spontanes Assembly von in *E. coli* exprimiertem Marmosett-Hepatitisvirus-Coreprotein gebildet wurden, vor einer Infektion durch Marmosett-Hepatitisvirus (WHV) geschützt werden (Roos et al., 1989). Das gp160 von HIV aggregierte in Insektenzellen spontan zu VLPs, die in Meerschweinchen die Bildung neutralisierender Antikörper induzierten (Rovinski et al., 1995). Das in Insektenzellen exprimierte Kapsidprotein des Norwalkvirus bildete VLPs, die in Mäusen eine systemische und mukosale Immunantwort induzierten (Ball et al., 1998).

1.1.3. *Virus-ähnliche Partikel als Träger für fremde Epitope*

Synthetische Peptide und monomere rekombinante Proteine sind in der Regel nur gering immunogen. In den vergangenen Jahren sind gentechnische Methoden eingesetzt worden, um die Immunantwort gegen Peptide durch Herstellung von Fusionsproteinen zu stimulieren (siehe 1.1). Eine besonders hoffnungsvolle Möglichkeit ist die gentechnische Verknüpfung von Proteinabschnitten mit VLPs. Die so hergestellten sogenannten „chimären“ VLPs können als effektive Träger für B-Zell- und T-Zell-Epitope benutzt werden. Die VLPs enthalten mehrere Kopien des VLPs-Trägerproteins und somit mehrere Kopien jedes zugefügten Antigens (Ulrich et al., 1996). Die zugefügten Antigene (Proteine oder Peptide) nehmen mit großer Wahrscheinlichkeit die gleiche dreidimensionale Struktur an, die sie im ursprünglichen Virus hatten. Als Teil der chimären VLPs werden diese fremden Proteinabschnitte dem Immunsystem in partikulärer Form präsentiert. Einige VLPs-Trägerproteine, wie z.B. das HBcAg, besitzen T_H-Epitope, die eine starke Immunantwort sowohl gegen das HbcAg als auch das fremde Epitop induzieren (Clarke et al., 1990). Neben den Insert-spezifischen Antikörpern können chimäre VLPs auch cytotoxische T-Zellen induzieren (Griffiths et al., 1993). Bevorzugte Träger für Fremdepitope sind HBcAg (Schödel et al., 1994) und HBsAg des Hepatitis B-Virus (Michel et al., 1993) , das Hefe-Retrotransposon Ty-Protein p1 (Adams et al., 1994), lentivirale Gag-Proteine (Wagner et al., 1994) und Phagencoatproteine (Mastico et al., 1993). Das HBcAg ist einer der am meisten verwendeten VLP-Träger für Fremdepitope (Ulrich et al., 1998). Mit Hilfe chimärer Corepartikel des Hepatitis B Virus konnte die Bildung virusneutralisierender Antikörper (Chambers et al., 1996) und z.T. eine protektive Immunantwort in Tiermodellen induziert werden (Clarke et al., 1987; Boulter et al., 1995; Ulrich et al., 1998). Humorale und zellvermittelte Immunantworten wurden durch Corepartikel induziert, die Circumsporozoite-Antigen von *Plasmodium falciparum* und *P. berghei* (Schödel et al.,

1994b) tragen. Vor kurzem wurde auch über die Verwendung genetisch veränderter Pflanzenviren als Träger für Fremdepitope berichtet (Brennan et al., 1999).

1.1.4. Bestimmung potentieller Insertionsorte für Fremdproteinsegmente in VLP-Trägermolekülen durch Epitopkartierung

Das systematische Abtasten eines Proteins durch Antipeptid- und Antiprotein-Antikörper bezeichnet man als Epitopkartierung, wobei überwiegend kontinuierliche B-Zellepitope erfaßt werden (Günther et al., 1992). Typischerweise besitzen Makromoleküle mehrere Determinanten, die jede per Definition von einem Antikörper gebunden werden kann (Weiss et al., 1997).

In einem Proteinantigen gibt es hauptsächlich zwei Arten von Epitopen (Lenstra et al., 1990): Lineare (sequentielle) und konformationelle (assemblierte). Bei Proteinen werden Epitope, die sich aus der primären Aminosäuresequenz ergeben, lineare Determinanten genannt. Man nimmt an, daß bei einem Proteinantigen die maximale Länge von linearen Determinanten, die Kontakt mit einem spezifischen Antikörper aufnehmen können, nicht mehr als 8 Aminosäuren beträgt (Geysen et al., 1986). Lineare Determinanten können im nativ gefalteten Protein für Antikörper erkennbar sein, falls sie auf der Oberfläche oder in einer ausgestülpten Region lokalisiert sind. Lineare Determinanten sind jedoch oft in der nativen Proteinkonformation nicht zugänglich und werden erst im denaturierten Protein erkannt. Im Gegensatz dazu werden konformationelle Determinanten nicht durch nebeneinander liegende Aminosäuren der linearen Sequenz ausgebildet, sondern durch solche, die erst durch die Proteinfaltung in Nachbarschaft kommen. Manchmal kommt es, daß ein Teil eines konformationellen Epitops durch synthetische Peptide imitiert wird. Solche Epitope werden Mimotop genannt (Geysen et al., 1986). Die meisten Epitope eines nativen Proteinantigens sind konformationsabhängig.

Verschiedene Methoden sind zur Kartierung von konformationellen und linearen Epitopen entwickelt worden. Die Auswahl der Methoden zur Epitopkartierung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben der mengenmäßigen Verfügbarkeit des Proteinantigens, spielen auch die Art der verwendeten Antikörper und die Ziele der Kartierung eine wichtige Rolle. Die chemische (Morris et al., 1996) und enzymatische Proteinfragmentierung (Maria et al., 1996; Rawling et al., 1995) sowie die Subklonierung des entsprechenden Gens (Lenstra et al., 1990) zählen zu den häufig benutzten Methoden der Epitopkartierung. Neben diesen genannten Methoden werden auch die Methoden des Protein foot printing (Jemmensen et al., 1986), der Expression von Peptiden unterschiedlicher Länge auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen (Kishchenko et al., 1994) und die simultane multiple Peptidsynthese (Maeji et al., 1995) für die Kartierung von linearen B-Zell Epitopen eingesetzt.

Eine vielversprechende Methode für die Vorhersage von Oberflächen-exponierten Regionen eines Proteins ist das Homology-modelling. Diese Methode beruht auf der Annahme, daß stark homologe Primärsequenzen zur Ausbildung ähnlicher Strukturen führen. Aus bekannten Kristallstrukturdaten und

der abgeleiteten dreidimensionalen Struktur eines Proteins und aus der bekannten Primärstruktur eines homologen, zu untersuchenden Proteins konnten durch Homology-modelling die wahrscheinliche Raumstruktur und damit Oberflächen-exponierte Bereiche vorhergesagt werden (Rost et al., 1993; Schneider et al., 1996).

1.2. Polyomavirus-ähnliche Partikel als potentielle Vehikel für die Gentherapie

1.2.1. Genomorganisation der Polyomaviren

Die Polyomaviren bilden eine Subfamilie innerhalb der Familie der *Papovaviridae* (Cole et al., 1996). Sie lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: zum einen SV40 und SV40-ähnliche Viren - hierzu zählen auch die humanpathogenen BK- und JC-Viren, zum anderen die eigentlichen Polyomaviren, wobei das der Maus bisher am besten untersucht ist. Die tumorerzeugenden Eigenschaften des Mauspolyomavirus wurden 1953 von Ludwik Gross entdeckt. Er fand, daß Zellextrakte von an Leukämie erkrankten Mäusen nach Übertragung auf gesunde Tiere verschiedene Typen von Tumorerkrankungen, nämlich Leukämien und Tumoren der Speicheldrüse, hervorrufen können. Die Isolierung des Polyomavirus der Maus gelang Stewart und Eddy 1957/1958 (Cole et al., 1996). Der Name Polyoma leitet sich von der Eigenschaft dieser Viren ab, in verschiedenen Organen Tumoren erzeugen zu können (Yi et al., 1998). Bis heute sind die kompletten Nukleotidsequenzen von 12 Vertretern der *Polyomavirinae* ermittelt worden (James et al., 1994). Vergleiche der Nukleotidsequenzen zeigten, daß alle Polyomaviren eine ähnliche Genomorganisation und Strategie der genomischen Replikation und Expression besitzen.

Polyomaviren besitzen ein kovalent geschlossenes und somit zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von ca. 5200 bp [5243 bp bei SV40 (Stamm776), 5130 bp bei JCV (Mad1), 5153 bp bei BKV (Dun) und 5297 bp beim murinen Polyomavirus Py (A2)]. Das Polyomavirion mißt 40-45nm im Durchmesser, hat eine Dichte von 1.34-1.35 g/cm³ (Barbanti-Brodano et al., 1998; Cole et al., 1996) und ein Molekulargewicht von 27×10^6 (Tooze et al., 1981). Das ikosaedrische Kapsid der Polyomaviren besteht aus 72 Kapsomeren in T=7d Symmetrie (Finch et al., 1974).

Das DNA-Genom läßt sich nach dem Zeitpunkt der Genexpression in zwei Bereiche einteilen. Der frühe Bereich kodiert drei Proteine, welche man als Tumor (T)-Antigene bezeichnet. Während das murine Polyomavirus (Py) und das Hamsterpolyomavirus (HaPV) drei T-Antigene (large, middle, small) kodieren, kodiert die frühe Region von SV40, BKV, JCV und anderen Polyomaviren nur zwei T-Antigene (large T und small T; Barbanti-Brodano et al., 1998). Der späte Genombereich kodiert für die viralen Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 (siehe 1.6). Neben den T-Antigenen und den Kapsidproteinen ist bei SV40, BKV und JCV ein kleines basisches Protein beobachtet worden. Es wird

vermutet, daß dieses basische Protein (Agnoprotein) beim viralen Zusammenbau und der Prozessierung der späten mRNA eine Rolle spielt (Alwine et al., 1982; Ng et al., 1985). Beim murinen Polyomavirus Py werden die drei viralen Strukturproteine von 3 verschiedenen mRNAs translatiert. Dagegen werden bei SV40 nur 2 unterschiedliche mRNAs für die Expression der drei späten Proteine synthetisiert (Grass et al., 1987; Hay et al., 1982). Zwischen den Ausgangspunkten für die Transkription der frühen und späten Regionen liegt ein nicht-kodierender Bereich von 400bp. Dieser Bereich enthält regulatorische Sequenzen: den Replikationsursprung, die Promotoren für frühe und späte Region und eine Enhancer-Region zur Regulation und Verstärkung der Transkription (Tooze et al., 1981).

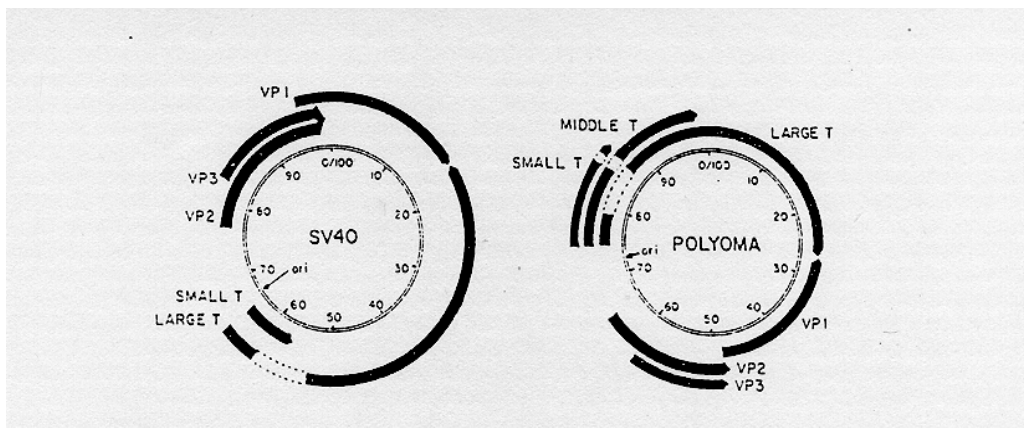


Abb. 1: Genomorganisation von SV40 und Maus-Polyomavirus Py. Die ausgefüllten Bereiche stellen die kodierenden Sequenzen des viralen Genoms dar. Die gespleißten Introns sind durch unterbrochene Linien dargestellt (nach Fields, 1990).

1.2.2. Frühe Proteine der Polyomaviren

Die Produkte der frühen Region der Polyomaviren sind für die Induktion und Erhaltung der Transformation verantwortlich (Yi et al., 1998). Die Tumorinduktion durch SV40 und murines Polyomavirus Py ist mit einem nicht produktiven Infektionszyklus verbunden (Cole et al., 1996). Das large T von SV40 und Mauspolyomavirus Py besitzt die Fähigkeit zur Induktion einer Zellimmortalisierung (Colby et al., 1982; Tevethia et al., 1998). Die transformierende Wirkung des large T basiert auf der Bindung an zelluläre Proteine, die zu den Tumorsuppressorproteinen oder Antionkogenen gehören (Yi et al., 1998; Chen et al., 1998). Das large T von Mauspolyomavirus, von SV40, BKV und JCV bilden einen Komplex mit dem Retinoblastoma-Protein (pRb 105/107), das die Transkription bestimmter zellulärer Gene beeinflusst (Decaprio et al. 1988; Dyson et al., 1990). Außerdem haben die large T der genannten Viren die Fähigkeit, an das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 (Barbanti-Brodano et al., 1998) zu binden, das an der Regulation der Zellteilung beteiligt ist. Durch die Interaktion mit dem viralen Protein werden die Tumorsuppressorproteine inaktiviert und damit die Regulation der Zellteilung gestört (Chen et al.,

1998). Chen et al. (1998) konnten zeigen, daß das SV40-large T in immortalisierten menschlichen Epithelzellen Apoptose induzieren kann. Es wird vermutet, daß das middle T des Mauspolyomavirus zusammen mit dem large T-Antigen die Zelltransformation induziert. Biochemische und genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß das middle T-Antigen einen Komplex mit dem zellulären Protoonkogen pp60src (Courtneidge et al.; 1983 und 1985; Kornbluth et al., 1987) und mit zwei weiteren zellulären Proteinen, nämlich Phosphatidylinositol-3 (PI-3)- Kinase (Auger et al., 1992) und Phosphatase 2A (Walter et al., 1990), bildet. Das small T der Polyomaviren ist nicht essentiell für die virale Replikation, fördert aber in bestimmten Situationen die Akkumulation der viralen DNA (Berger et al., 1986). Wie das middle T bildet auch das small T einen Komplex mit der zellulären Phosphatase 2A (Pallas et al., 1990)

1.2.3. Strukturproteine der Polyomaviren

Die späten Proteine der Polyomaviren werden als VP1, VP2 und VP3 bezeichnet. Das ikosaedrische Kapsid der Polyomaviren ist aus 72 Pentameren aufgebaut. Somit enthält das Kapsid 360 Kopien des monomeren Hauptkapsidproteins VP1 (Rayment et al., 1982). Im viralen Kapsid sind die kleineren Strukturproteine (VP2/VP3) in geringerer Menge vorhanden. Es wird vermutet, daß ein Molekül von VP2 oder VP3 (oder beide) mit einem VP1-Pentamer assoziiert sind (Tooze et al., 1981; Lin et al., 1984). Wahrscheinlich sind sie im Inneren der VP1- Pentamere lokalisiert (Liddington et al., 1991; Griffith et al., 1992; Barouch et al., 1994). Das VP1 stellt das Hauptstrukturprotein des viralen Kapsids dar. Es bildet 75%-80% der gesamten Kapsidproteinmenge (Gillock et al., 1998). Als äußeres Kapsidprotein ist das VP1 auch für die Bindung der Polyomaviren an zelluläre Rezeptoren verantwortlich (Marriott et al., 1985; Li et al., 1994). Für Partikel des Mauspolyomavirus PyA2 existiert eine hochauflösende Röntgenkristallstruktur im Komplex mit zwei Sialyl-oligosaccharid-Fragmenten, die Bestandteil der zellulären Rezeptoren sind (Haun et al., 1993; Hermann et al., 1995; Stehle et al., 1997). Für LPV-VP1 wird vermutet, daß α -2,6-Sialylsäure als essentieller Bestandteil im zellulären Rezeptor vorkommt (Haun et al., 1993). Die hämagglutinierende Eigenschaft der meisten Polyomaviren ist auf die Wechselwirkung des VP1 mit den Rezeptoren auf der Erythrozytenoberfläche zurückzuführen (Tooze et al., 1981). Die Hämagglutination kann durch VP1-spezifische Antikörper gehemmt werden (Bolen et al., 1981). Für das murine Polyomavirus konnte gezeigt werden, daß ein Aminosäureaustausch im VP1 zur Entstehung von Virusisolaten mit unterschiedlichen Tumor-induzierenden Eigenschaften führt (Li et al., 1994). Sowohl für SV40 als auch für das murine Polyomavirus konnte gezeigt werden, daß die Strukturproteine, insbesondere das Hauptstrukturprotein VP1, die Fähigkeit besitzen, DNA in sequenzunspezifisch zu binden (Soussi et al., 1986; Moreland et al., 1991; Chang et al., 1993; Dean et al., 1995). Im Gegensatz zu VP2/VP3 von SV40 (Clever et al., 1993) binden VP2/VP3 des murinen Polyomavirus keine DNA (Chang et al., 1992 und 1993). Eine DNA-bindende Region ist am N-Terminus des VP1 von Polyomaviren lokalisiert worden, die mit einem Kernlokalisierungssignal überlappt (Gillock et al., 1998). Die Strukturproteine der Polyomaviren sind unterschiedlich posttranslational modifiziert. Das Hauptstrukturprotein VP1 ist beim murinen Polyomavirus und SV40 phosphoryliert und acetyliert (Bolen et al., 1981; Anders et al., 1983; Garcea et al., 1985; Fattaey et al., 1989). Für das murine Polyomavirus wurde gezeigt, daß dessen VP1 Hydroxyprolin enthält (Ludlow et al., 1989). Bei Co-Expression der Strukturproteine in Insektenzellen

konnte gezeigt werden, daß die Modifikation des Hauptstrukturproteins VP1 von VP2 beeinflusst wird (Forstova et al., 1993). Das VP2 des Mauspolyomavirus trägt am N-terminalen Glycin-Rest eine Myristylierung (Streuli et al., 1989). Diese Modifikation am VP2 ist für eine effiziente Infektion von Mauszellen durch Mauspolyomavirus notwendig (Krauzewicz et al., 1990; Forstova et al., 1993). Die genannten Modifikationen finden sehr wahrscheinlich vor dem eigentlichen Virusassembly statt (Leavitt et al., 1985).

1.2.4. *Das Hamster-Polyomavirus*

Das Hamster-Polyomavirus (HaPV) wurde erstmals von Graffi (Graffi et al., 1967 und 1968) als ätiologisches Agens spontan auftretender papillomatöser Tumoren der Haut beschrieben, die in einer in Berlin-Buch geführten Goldhamsterzucht (Z3/BlN) beobachtet wurden. Bei 5-10 % der 6-9 Monate alten Tiere entwickelten sich multiple papillomatöse Wucherungen im Bereich des Unterkiefers, die sich innerhalb weniger Wochen über den gesamten Körper des Tieres ausbreiteten. Die Tumoren gehen von Zellen des Haarwurzelepithels aus. Als Ursache des gehäuftten Auftretens der Geschwülste wurde eine Aktivierung und Anreicherung eines im Hamsterembryonen-Material latent vorhandenen Papovavirus angenommen, da im tumorösen Gewebe ein im Durchmesser ca. 45nm großes, pseudokristallin angeordnetes Virus nachgewiesen werden konnte (Graffi et al., 1967). Aus den Epitheliomen konnten große Mengen an Viruspartikeln isoliert werden (Graffi et al., 1969). Die Virionen sind sphärisch mit einem Durchmesser von ca. 45nm und enthalten ein zirkuläres ds-DNA-Molekül mit einem Molekulargewicht von rund $3,1 \times 10^6$ (Scherneck et al., 1987). Nach subkutaner Injektion von HaPV in neugeborene Hamster aus einer anderen, in Potsdam gezüchteten Hamsterkolonie (HaP-Hamster) ergab sich ein überraschender Befund. In 60-80% der behandelten Tiere wurden nach einer Latenzperiode von 4-6 Wochen Lymphome induziert (Graffi et al., 1968). Im Unterschied zu den Epitheliomen, in denen reife HaPV-Partikel produziert werden, werden in Lymphomen große Mengen extrachromosomaler HaPV-DNA akkumuliert, ohne daß Viruspartikel nachgewiesen werden können (Scherneck et al., 1987; Prokoph et al. 1996., und 1997). Ein ähnlicher Verlauf der Tumorentstehung wurde auch in Hamsterkolonien in den USA beschrieben (Courtneidge et al., 1991). Für das Genom des HaPV transgene Mäuse entwickelten auch Epitheliome und Lymphome (Courtneidge et al., 1991). Die extrachromosomale HaPV-DNA in den Lymphomen enthält charakteristische Deletionen, von denen die regulatorische Region und benachbarte kodierende Sequenzen der späten Region des HaPV-Genoms betroffen sind (Scherneck et al., 1987). Diese Deletionen in der späten Region könnten die Ursache dafür sein, daß in HaPV-induzierten Lymphomen keine Viruspartikel gebildet werden können (Scherneck et al., 1987). Die HaPV-vermittelte Induktion von Lymphomen in HaP-Hamstern wird möglicherweise durch die Wechselwirkung des middle T mit p59fyn (Tyrosin-Kinase in Lymphocyten) vermittelt (Courtneidge et al., 1991). Obgleich die Induktion von Lymphomen und Leukämien in hemopoietischen Zellen und Epitheliomen in undifferenzierten Keratinozyten einzigartig unter den Polyomaviren ist (de la Roche Saint Andre et al., 1990 und 1993), wurde ein Lymphotropismus auch für andere Polyomaviren beschrieben. So kann SV40 bei intravenöser Injektion in Syrische Hamster ein breites Spektrum von hemopoietischen Tumoren induzieren (Diamandopoulos et al., 1972). Das aus B-Lymphoid-Zelllinien von Affen isolierte lymphotrope Papovavirus LPV kann nur in hemopoietischen Zellen replizieren (Pawlita et al., 1985).

Das DNA-Genom des Hamsterpolyomavirus ist aus Virionen, die aus einem Pool von Epitheliomen isoliert wurden, in einen *E. coli*-Vektor kloniert (Zimmermann et al., 1984) und sequenziert worden (Delmas et al., 1985). Das virale Genom ist ein doppelsträngiges zirkuläres DNA-Molekül mit einer Länge von 5,366 bp (Scherneck et al., 1987). Das virale Genom von HaPV ist ähnlich wie das Genom des murinen Polyomavirus Py aufgebaut. Nach dem Zeitpunkt der Genexpression ist das Genom von HaPV in zwei Regionen gegliedert: Die frühe Region kodiert 3 Proteine, large T-, middle T- und small T- Antigen, die für Immortalisierung (large T) und Transformation (middle T, small T) verantwortlich sind (Gouterbroze et al., 1992). Die späte Region kodiert die 3 Strukturproteine VP1, VP2 und VP3. Zwischen später und früher Region ist die regulatorische Region mit Origin, Promotoren für frühe und späte Region und Enhancer-Elementen lokalisiert (Delmas et al., 1985).

Untersuchungen zur evolutionären Verwandtschaft des Hamster-Polyomavirus zu anderen Polyomaviren (murines Polyomavirus Py, BKV, JCV) über Sequenzvergleiche und Hetero-duplex-Analysen ergaben besonders auffällige Homologien vor allem in kodierenden Bereichen für das Hauptkapsidprotein VP1 und für das large T, was auf die besondere Bedeutung dieser Genprodukte für die Replikationsfähigkeit der Polyomaviren hinweist. Sowohl die VP1 als auch die large T-Antigen-kodierende Sequenz stehen unter hohem Selektionsdruck im Hinblick auf die Zusammensetzung des viralen Kapsids und der spezifischen Funktion des T-Antigens für die virale DNA-Replikation (Vogel et al., 1986).

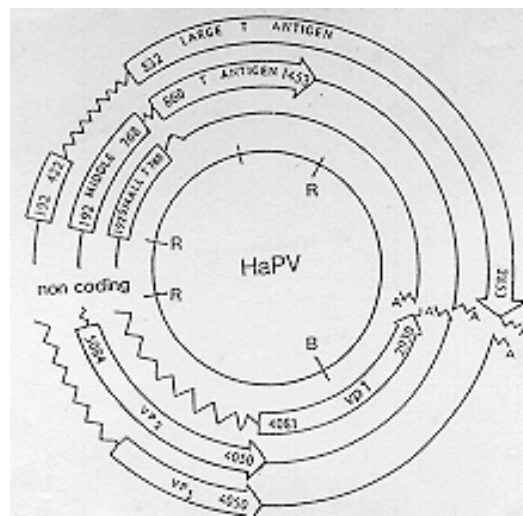


Abb. 2: Lokalisation der kodierenden Abschnitte für die frühen Proteine large T, middle T und small T und für die späten Proteine VP1, VP2 und VP3 im HaPV-Genom (nach Delmas et al. ., 1985).

Die nicht-kodierenden Bereiche sind durch einfache Linien; durch differenziertes Spleißen der prä-mRNA ausgeschnittene Introns sind durch Wellenlinien angedeutet.

1.2.5. Polyomavirus-abgeleitete Partikel als Transportsysteme in der Gentherapie

Als Somatische Gentherapie werden alle Verfahren bezeichnet, die die Korrektur eines genetischen Defektes ausschließlich in somatischen Zellen (Körperzellen) zum Ziel haben. Die dadurch entstandenen genetischen Veränderungen können daher nicht an die nächste Generation weitergegeben werden. Praktisch laufen alle Therapieansätze darauf hinaus, ein intaktes Gen in genetisch defekte Zellen einzuschleusen und dort in einer Weise zur Expression zu bringen, daß die Fehlfunktionen des defekten Gens ausgeglichen werden (Crystal et al., 1995). Das erste gentherapeutische Experiment bei einer monogen bedingte Erbkrankheit wurde 1990 mit der Behandlung eines jungen Mädchens, das an Adenosindesaminase-Mangel litt, in den USA begonnen (Anderson et al., 1992; Morgen et al., 1993). Weltweit werden gegenwärtig viele verschiedene gentherapeutische Ansätze in Kliniken durchgeführt. Bisher ist es jedoch mit keiner der angewendeten Methoden gelungen, einen signifikanten und dauerhaften Heilungsprozeß einzuleiten. Das gegenwärtige Hauptproblem der Gentherapie ist das Erreichen einer möglichst hohen Aufnahme rate des genetischen Materials durch die Empfängerzelle. Zur Einschleusung von DNA in Zellen stehen grundsätzlich zwei Verfahren zur Verfügung: der virale und der nicht-virale Gentransfer (Schofield et al., 1995).

Bei viralen Transfermethoden werden genetisch modifizierte Viren (virale Vektoren) als Transportvehikel genutzt (Klein et al., 1997). Besonders geeignet dafür sind Viren, die ihr Genom im Verlauf des viralen Replikationszyklus stabil in die Chromosomen der Wirtszelle integrieren. Die stabile Integration könnte somit eine dauerhafte Expression des Fremdgens ermöglichen. Der DNA-Transfer mit Hilfe viraler Systeme ist grundsätzlich effektiver als der Transfer mit physikalisch-chemischen Methoden. Als Transportsysteme für die gentherapeutisch wirksamen Nukleinsäuren wurden bisher vor allem Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren verwendet (Klein et al., 1997). Ein großer Vorteil der retroviralen Vektoren in der Gentherapie ist deren hocheffiziente Transfektion von teilungsfähigen Zellen, die Integration der retroviralen Vektoren in das Wirtsgenom und die daraus resultierende stabile Expression der Fremdgene. Die Hauptnachteile der retroviralen Vektoren liegen in deren Unfähigkeit, nicht-teilungsfähige Zellen zu infizieren, und ihrer Inaktivierung durch das Komplementsystem. Desweiteren sind bei Virusvermehrung nur geringe Titer zu erreichen (Wickham et al., 1997). Eine Gefahr bei *in vivo*-Anwendungen retroviraler Vektoren ist das Rearrangement des viralen genetischen Materials zu replikationsfähigen Viruspartikeln und die Insertionsmutagenese (Crystal et al., 1995). Adenoviren können als Transportvehikel genutzt werden, um *in vivo*-Gentherapien auch an nicht-replizierenden Zellen durchzuführen (Short et al., 1994). Weil Adenoviren jedoch nicht in das Genom der Wirtszellen integriert werden, wurde nur eine instabile Genexpression der transferierten DNA beobachtet (Mulligan et al., 1993). Neben dem bereits erwähnten Risiko der Entstehung infektiöser Viruspartikel ist ein weiterer entscheidender Nachteil viraler Vektorsysteme ihre starke Immunogenität (Crystal et al., 1995). Dadurch können die Virusvektoren nach mehrmaliger Applikation relativ schnell durch das Immunsystem eliminiert werden (Short et al., 1994). Darüber hinaus weisen die bisher verwendeten Viren eine geringe Zellspezifität auf (Klein et al., 1997). Neben Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren konnten auch Baculoviren als Transportvehikel in der Gentherapie eingesetzt werden, die jedoch in humanen Zellen nicht repliziert werden (Shoji et al., 1997; Hofmann et al., 1995).

Als Alternative sind nicht-virale Transfermethoden entwickelt worden (Morgan et al., 1993). Im Gegensatz zu den viralen Transfermethoden wird bei nicht-viralen Transfermethoden kein unerwünschtes genetisches Material in die Zellen eingeschleust (Morgan et al., 1993). Nicht-virale Transfermethoden sind insbesondere für den *in vivo*-Einsatz geeignet. Der Nachteil des nicht-viralen Gentransfers ist die fehlende Integration des transferierten DNA-Fragments in den Zellen (Morgan et al., 1993). Deshalb konnten stabile Expressionsraten des transferierten

Gens über längere Zeiträume noch nicht erzielt werden. Als nicht-virale Gentransfermethoden sind insbesondere kationische Liposomen, direkte DNA-Injektion und ein rezeptorvermittelter Gentransfer eingesetzt worden (Schofield et al., 1995). Die Wirksamkeit des rezeptorvermittelten Gentransfers wurde erfolgreich an Leberzellen (Hepatocyten) gezeigt (Wagner et al., 1992; Engelhardt et al., 1994; Perales et al., 1994).

Virus-ähnliche Partikel (VLPs) insbesondere auf der Basis von Polyomavirus-Kapsiden, stellen eine neue Entwicklung bei den gentherapeutischen Transportsystemen dar (Forstova et al., 1995; Strayer et al., 1996; Sandalon et al., 1997; Soeda et al., 1998; Stokrova et al., 1999; Braun et al., 1999). Diese Partikel enthalten keine virale Nukleinsäure und sind deshalb nicht infektiös. Das VP1 verschiedener Polyomaviren assemblierte nach heterologer Expression in Insektenzellen zu VLPs (Montross et al., 1991; Forstova et al., 1993; Kosukegawa et al., 1996). In *E. coli* exprimiertes VP1 des murinen und aviären Polyomavirus bildete Kapsomere, die anschließend *in vitro* assembliert werden konnten (Salunke et al., 1986 und 1989; Rodgers et al., 1994).

Die gereinigten VP1-abgeleiteten VLPs können *in vitro* sehr einfach in die einzelnen Komponenten (Kapsomere) zerlegt und anschließend wieder zusammengesetzt werden. Die Möglichkeit während des Reassoziationschrittes DNA in die VLPs zu verpacken, macht sie zu einem attraktiven Transportsystem für die Gentherapie. Die DNA-Verpackung erfolgt im Rahmen einer Abfolge von Dissoziations- und Reassoziationschritten. In verschiedenen Zelltests wurden keine bzw. nur sehr geringe toxische Nebeneffekte beobachtet, eine grundsätzliche Voraussetzung für den möglichen Einsatz als Transportsystem. In weiteren Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß die verpackte DNA mittels der VLPs effizient in verschiedene Zelllinien eingeschleust werden kann (Goldmann et al., 1999).

1.3. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Etablierung eines neuartigen Systems zur Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) als Träger für Fremdproteinsequenzen (zur Anwendung in der Vakzineentwicklung) und für fremde Nukleinsäure (in der Gentherapie). Die VLPs sollten auf der Basis des Kapsidproteins VP1 des Hamsterpolyomavirus hergestellt werden. Dazu sollte das VP1 in Insektenzellen synthetisiert, gereinigt und seine Assemblierung untersucht werden. Durch Vorhersage und Kartierung von Epitopen sollten potentielle Insertionsorte für Fremdsequenzen im VP1-Träger bestimmt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Biologische Materialien

2.1.1. Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde von Papillom-tragenden Z3-Hamstern entnommen. Die Papillome wurden an Rücken, Bauch, Extremitäten, Kieferregion, Unter- und Oberkiefer, Kopf (Stirn, zwischen den Ohren, Nacken, Hals), Augenlidern und zum Teil auf der gesamten Körperoberfläche gefunden. Die entnommenen Papillome wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.2. Lebergewebe

Lebergewebe wurde von HaPV-freien HaP-Hamstern entnommen. Nach Entnahme wurde das Lebergewebe bei -20°C aufbewahrt.

2.1.3. Verwendete Plasmide

Für die Expression des HaPV-Kapsidproteins VP1 in *E. coli* wurden pQE-Vektoren (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Sie enthalten ein optimiertes, regulierbares Promotor/ Operator-Element (*E. coli*-Phagen T5-Promotor, lac-Operator), eine synthetische Ribosomenbindungsstelle, einen Schwanz aus 6 Histidin-Kodonen, eine Maus-Dihydrofolatreduktase-kodierende Sequenz (Chang et al., 1978; Masters and Attardi, 1983), einen Polylinker, Translations-Stopkodonen in allen 3 Leserahmen, sowie den Replikationsorigin und das β -Lactamase-Gen des Plasmids pBR322 (Sutcliffe, 1979).

Das mit pBacPak 9 (Clontech, CA, USA) bezeichnete Plasmid mit Polyhedrin-Promotor wurde für die Expression des HaPV-Kapsidproteins in Insektenzellen verwendet. Die Herstellung rekombinanter Baculoviren erfolgte mit Hilfe des Baculo-Gold-Systems (Pharmingen, San Diego, USA).

Die Plasmide pFR36-VP1/2-12 und pFR36-VP1/2-9 enthalten die komplette VP1-kodierende Sequenz des HaPV, beginnend mit dem authentischen (2.ATG) oder einem upstream (stromaufwärts) liegenden Translationsinitiationssignal (1.ATG).

2.1.4. Bakterienstämme

Alle Primärtransformationen erfolgten in den *E. coli* K12-Stamm XL-1Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB lacIq lacZ ΔM15 Tu (tet^r)*] ; Bullock et al., 1987).

Für die Expression der DHFR-Fusionsproteine wurden die pQE-abgeleiteten Plasmide in den Stamm M15pREP4 (*Nal Str rif lac ara recA Uvr F ara gal mtl*; Villarejo et al., 1974; Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) retransformiert.

2.1.5. Insektenzellen

Für die Proteinexpression im Baculovirussystem wurde die permanente Zelllinie Sf9 von *Spodoptera frugiperda* benutzt.

2.1.6. Hamsterseren

Zur Epitopkartierung wurden Seren von HaPV-infizierten Z3-Hamstern verwendet, die durch das Vorhandensein bzw. Fehlen von Papillomen gekennzeichnet waren (Tab. 1 und 2).

Tab. 1: Übersicht über die pathologischen Befunde der untersuchten Z3-Hamster (Berlin-Buch)

Tiernummer	Geschlecht	Alter (in Tagen)	Papillom-Lokalisation
31	weiblich	268	Augenlid, Kieferregion und Ohren
33	weiblich	268	Augenlid, Kieferregion und Ohren
l533	männlich	483	Augenlid, Kieferregion und Ohren
l558	männlich	455	Kieferregion, Unter- und Oberkiefer
559	männlich	455	Unter- und Oberkiefer
486	männlich	631	auf der gesamten Körperoberfläche
l479	männlich	keine Angabe	Kieferregion, Unter- und Oberkiefer
521	männlich	keine Angabe	auf der gesamten Körperoberfläche
608	männlich	313	Kopf (Stirn, Ohren), Nacken und Hals
581	weiblich	369	Auf der gesamten Körperoberfläche

Für die Gewinnung und Konservierung der Hamsterseren wurde das Blut in Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Das Vollblut wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend für 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde vorsichtig abgenommen und erneut 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Seren wurden in kleineren Portionen abgefüllt und bei -20 °C eingefroren.

Zur Kontrolle wurden Seren von nichtinfizierten HaP-Hamstern (2 weibliche Tiere: 78/1;78/3; 3 männliche Tiere: 78/2, 78/5,78/6) entnommen.

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Z3-Hamster ohne Papillombildung

Tiernummer	Geschlecht	Alter (in Tagen)
1	männlich	295
582	männlich	295
32	weiblich	268
I531	weiblich	483
I555	weiblich	455
556	weiblich	455
602	weiblich	308
607	männlich	308
456	männlich	682
457	männlich	682
523	weiblich	653
502	weiblich	232
595	männlich	317
598	weiblich	312
599	weiblich	312
600	männlich	312
616	weiblich	290
617	weiblich	290
618	weiblich	290

2.1.7. Monospezifische Kaninchen-anti-VP1-Seren

Tab. 3: Herkunft der Kaninchen-anti-VP1-Seren

Serum	zur Verfügung gestellt von	Verdünnung
Anti-SV40	Dr. Lüke, Göttingen	1:500
Anti- JCV-VP1	Dr. Lüke, Göttingen	1:500
Anti-HaPV-VP1	Dr. Ulrich, Berlin	1:100
Anti-LPV-VP1	Dr. Pawlita, Heidelberg	1:500
Anti-Murines Polyomavirus	Dr. Pawlita, Heidelberg	1:100

2.1.8. Enzyme

- alkalische Phosphatase (1U/μl), Boehringer Mannheim
- Lysozym, Boehringer Mannheim
- Restriktionsendonukleasen, Boehringer Mannheim/ MBI Fermentas
- RNase A, Boehringer Mannheim
- T4-DNA-Ligase (1 U/μl), Boehringer Mannheim

2.1.9. DNA-Molekulargewichtsmarker

- λ-DNA *Hind*III Marker (MBI Fermentas)

Fragmente: 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 bp

2.1.10. LMW Electrophoresis Calibration kit (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)

Phosphorylase b	94 kDa
Bovines Serumalbumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsininhibitor der Sojabohne	20,1 kDa
α-Lactalbumin	14,4 kDa

2. 2. Methoden zur Virusisolierung und Gewebeaufarbeitung

2.2.1. Reinigung von HaPV-Virionen (nach Böttger et al., 1971, modifiziert)

Zur Isolierung und Reinigung des HaPV wurden Papillome von HaPV-infizierten Z3-Hamstern verwendet. Dazu wurden 5 bis 10 g Tumorgewebe mit 30 ml PBS versetzt und 60 bis 90 min homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand aufbewahrt. Das Sediment wurde erneut in 30 ml PBS aufgenommen und 10mal 5 bis 6 sec mit Ultraschall (20% Amplitude) behandelt. Dann wurde die Suspension zentrifugiert und die beiden Überstände vereinigt. Die Viruspartikel wurden bei 28000 U/min (3 Stunden bei 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und in einem Gradientengemisch von CsCl (Dichte: 1,46 g/ml) und Saccharose (Dichte: 1,1 g/ml) gereinigt. Die Gradientenfraktionen wurden im Western blot mit Hilfe von VP1-spezifischen Antiseren charakterisiert.

2.2.2. Herstellung von Lebergewebsproben

Als Negativkontrolle für die Analyse der HaPV-Proteine im Western Blot wurde Lebergewebe aus HaPV-freien HaP-Hamstern verwendet. Dazu wurden 2,5 g Lebergewebe mit dem Skalpell zerkleinert und in 3 ml PBS (pH 7,2) suspendiert und homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (3000 U/min, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 0,5 ml Probenpuffer suspendiert und bei 100 °C für 7 min gekocht. Nach starkem Vortexen wurde die Suspension bei 12000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für den Western blot eingesetzt.

2.3. Methoden der DNA-Isolierung und –Reinigung

2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.1.1. Mini-Präparation durch alkalische Lyse

Durch alkalische Lyse bakterieller Zellen kann die Plasmid-DNA nach Ausfällen der restlichen zellulären Bestandteile, einschließlich chromosomaler DNA, isoliert werden (Sambrook et al., 1989).

Zu diesem Zweck wurden ausgehend von Einzelkolonien Kulturen in 2 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden dann 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 2 min (12000 U/min) bei Raumtemperatur sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde durch alkalische Lyse nach einer Standardmethode von Sambrook et al., 1989 aufgeschlossen. Die DNA wurde in 20 µl Wasser mit RNase (20 µg/ml) aufgelöst und bei -20 °C gelagert.

2.3.1.2. Plasmid-Midipräparation durch Säulen-Chromatographie

Mit Hilfe dieser Methode konnten 200-250 µg Plasmid-DNA aus 50 ml Übernachtskultur gewonnen werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß Standardprotokoll B des Herstellers (Talent, Trieste, Italien)

2.3.2. Reinigung und Präzipitation von DNA

2.3.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Extraktion von DNA-haltigen wässrigen Lösungen durch Phenol-Chloroform diente der Entfernung von Proteinen. Dazu wurde die DNA-haltige Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und durch starkes Schütteln gemischt. Die wässrige und organische Phase wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 12000 U/min getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Ethanolzugabe präzipitiert.

2.3.2.2. Ethanolpräzipitation

Zur Konzentrierung von DNA wurde DNA-haltige, wässrige Lösung mit 1/10 Volumen

3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumina 96 % Ethanol versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei -20 °C wurde die DNA für 5 min bei 4 °C und 12000 U/min pelletiert. Das Pellet wurde mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.3.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurde ein Aliquot der DNA-Präparation in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Molekulargewichtsmarker mit bekannten Konzentrationen an DNA dienten dabei als Referenz. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-Lösung bei 260 nm spektralphotometrisch gemessen (LKB Ultrospec plus Spectrophotometer; Pharmacia, Freiburg, Deutschland).

2.3.3. DNA-Klonierung

2.3.3.1. Restriktionsendonukleasespaltung

Zur analytischen Spaltung von Plasmid-DNA wurden 0,5-1,0 µg DNA eingesetzt; für präparative Zwecke wurden 5-10 µg DNA gespalten. Die Spaltungsansätze aus Wasser, Puffer (optimaler Puffer laut Hersteller-Protokoll), Restriktionsenzym und DNA wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.3.2. Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in Abhängigkeit von den Größen der DNA-Fragmente in 0,8 bzw. 1,5 %igen Agarosegelen unter Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer GNA-100 in 1xTAE-Puffer. DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Loadingpuffer gemischt und in die Probentaschen eingebracht. Die Elektrophorese wurde bei 80-100 V für 45-60 min durchgeführt.

2.3.3.3. Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Fragment-Isolation

Die Agarosegelelektrophorese wurde auch zur Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten im präparativen Ansatz benutzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA wurde mit Hilfe des Jetsorb Gel Extraction Kit (Jetsorb Kit; Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.3.4. Dephospholierung der Vektor-DNA

Zur Verhinderung der Rezirkularisierung von linearisierter Vektor-DNA wurde eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase) nach folgendem Schema durchgeführt:

Spaltungsansatz	30-50 µl
10x Puffer	10 µl

alkalische Phosphatase (1U/μl)	1 μl
Wasser auf	100μl

Der Reaktionsansatz wurde 90 min bei 37 °C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung (5 min bei 65 °C) wurde die Reaktion gestoppt und eine Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurden 500 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 400 μl bidestilliertes Wasser zugesetzt und 5 min kräftig geschüttelt. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mit Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in 20 μl TE-puffer (10 mM Tris-HCl , pH 8.0; 0,5 mM EDTA) resuspendiert.

2.3.3.5. Ligation

Zur kovalenten Verknüpfung von Vektor- und Fragment-DNA wurde nach folgendem Schema ein Ligationsansatz hergestellt:

Vektor	100 ng
Fragment	(3-5facher molarer Überschuß)
10xLigasepuffer	2 μl
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	0,5 μl
mit sterilem Wasser auf	20 μl

Die Reaktion fand über Nacht (18-20 Stunden) im Wasserbad bei 14-16 °C statt.

2.3.3.6. Herstellung kompetenter Zellen

Die Ein-Schritt-Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach Chung et al. (1989). Fünf Kolonien der Bakterien-Stammkultur wurden von einer Agarplatte in 2 ml LB-Medium (1 % Bactrotrypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 0,5 % NaCl; pH 7,5) überimpft und über Nacht geschüttelt (205-220 U/min, innova TM 4330 Schüttler, New Brunswick Scientific). Die Übernachtskultur wurde anschließend 1:50 in 50 ml LB-Medium verdünnt. Beim Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} =$

0,3-0,4) nach ca. 90 min wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 1500 U/min abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig in 5 ml 1xTSS Medium (LB-Medium pH 6,5 mit 10 % (w/v) PEG 8000, 5 % DMSO, 50 mM MgCl₂) resuspendiert. Die Bakterien wurden schockgefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3.3.7. Transformation

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden im Eisbad aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde zu 100-200 µl Zellen dazugegeben und der Ansatz dann 40 min in einem Eisbad inkubiert. Zur Kontrolle der Antibiotikawirksamkeit in den Selektionsplatten wurde ein Ansatz ohne Zugabe von DNA mitgeführt. Es folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C und eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz mit vorgewärmtem SOC-Medium auf 0,5 bzw. 1 ml aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Ende des einstündigen Schüttelns wurden zuerst 100 µl mit einem Drigalskispatel gleichmäßig auf Selektions-LB-Agarplatten (für XL-1Blue-Zellen mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Tetracyclin und für M15pREP4-Zellen mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) verteilt. Der Rest der Probe wurde 10 Sekunden bei 12000 U/min zentrifugiert, 300 bzw. 800 µl Überstand verworfen und nach Resuspendieren im verbliebenen Medium auf eine weitere Selektionsplatte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.3.8. Charakterisierung der rekombinanten Klone

Die aus rekombinanten Bakterien isolierte Plasmid-DNA (siehe 2.3.1.1) wurde mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten und damit auf Insertion eines HaPV-VP1-kodierenden Fragmentes und dessen Orientierung getestet.

2.3.4. Arbeiten mit Zellkulturen

2.3.4.1. Kultivierung der Insektenzellen

Die permanente Zelllinie Sf9 von *Spodoptera frugiperda* (freundlicherweise von Prof. Schmidt, Institut für Immunologie und Biochemie, FU Berlin, überlassen) wurde mit TC 100-Medium mit einem Zusatz von 10% FKS in 50-ml-Kulturflaschen kultiviert. Den in den Versuchen eingesetzten Kulturen wurden 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Streptomycin zum Medium zugegeben. Die Kulturen wurden in einem Schüttler bei 28 °C inkubiert.

2.3.4.2. Cotransfektion von Insektenzellen

Bei der Cotransfektion wurde eine deletierte Baculovirus-DNA, Baculo-Gold (Pharmingen, San Diego, USA), eingesetzt, die ohne Rekombination mit dem Transfervektor nicht vermehrungsfähig ist, so daß alle, nach der Cotransfektion entstehenden Viren das Fremdgen tragen sollten. Die Transfektion erfolgte nach der Lipofectin-Methode. Dazu wurden 0,25 µg Baculo-Gold-DNA und 1,25 µg Transfervektor-DNA, die das klonierte Fremdgen trägt, mit

6 µl Lipofectin versetzt und gemischt. Als Negativkontrolle wurden 1,25 µg Plasmid-DNA transfiziert. In 60 mm-Kulturschalen wurden $1,6 \times 10^6$ -Zellen ausgesät. Das Medium wurde entfernt und die DNA-Lösung dem Medium tropfenweise zugesetzt. Anschließend wurde die Kultur eine Stunde bei 28 °C inkubiert. Die Lösung wurde wieder entfernt und der Zellrasen mit 2 ml TC 100-Medium (mit 10% FKS und Antibiotika) überschichtet. Die Kulturen wurden für 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde für die weitere Isolierung und Vermehrung der Viren bei 4 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden auf Fremdproteinexpression untersucht.

2.3.4.3. Plaquereinigung rekombinanter Baculoviren

Die aus der Cotransfektion erhaltenen rekombinanten Baculoviren konnten mit Hilfe eines Plaquetests gereinigt werden. $1,6 \times 10^6$ Sf9-Zellen wurden zur Anheftung für 1-2 Stunden inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden 500 µl des Transfektionsüberstandes ($1:10^1$ bis $1:10^6$ mit TC100-Medium verdünnt) auf den Zellrasen getropft. Die Kulturen verblieben eine Stunde bei 28 °C. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Kultur mit 2 ml eines halbfesten Überschichtungmediums, dem sogenannten "overlay", aus einem Teil 2 % Sea-Plaque-Agarose in PBS und einem Teil TC 100-Medium mit 10% FKS, 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Streptomycin überschichtet. Bis zum Erstarren der Agarose wurden die Kulturen bei Raumtemperatur belassen. Damit das ÜberschichtungsmEDIUM nicht austrocknete, wurden die Kulturschalen mit Klarsichtfolie abgedeckt und so 5 bis 6 Tage bei 28 °C inkubiert. Um die durch die Virusvermehrung entstandenen Plaques sichtbar zu machen, wurden die lebenden Zellen mit Neutralrot angefärbt. Dies geschah durch Überschichten mit einer Neutralrot-Lösung (verdünnt 1:20 in PBS). Nach 6-stündiger Inkubation erschienen die Plaques als helle Bezirke im rot gefärbten Zellrasen. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde Zellmaterial aus diesen Plaques entnommen und in 1 ml TC100-Medium suspendiert. Aus dieser Suspension wurden Verdünnungen von $1:10^1$ bis $1:10^6$ in TC100-Medium hergestellt. Die beschriebene Reinigung wurde dreimal hintereinander durchgeführt.

2.3.4.4. Virusvermehrung

Um größere Mengen von Virussuspensionen mit hohem Titer zu gewinnen, wurden in 100-ml-Kolben $1,9 \times 10^8$ Sf9-Zellen eingesät. Die Suspensionskultur von Sf9-Zellen wurde mit einer $moi < 1$ der rekombinanten Baculoviren infiziert und 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Zellkulturüberstand und Zellmaterial wurden durch 20 minütige Zentrifugation bei 2500 U/min getrennt. Der Viruspartikel-enthaltende Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Das Zellsediment wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS bei -20 °C eingefroren.

2.3.5. Expression des HaPV-VP1 in *E. coli*

2.3.5.1 Synthese von rekombinanten VP1-Proteinen mittels pQE-Vektoren

Für die Expression der rekombinanten VP1-Proteine wurden pQE-Vektoren (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) verwendet (siehe 2.1.3). Die exprimierten Proteine tragen einen aus 6 Histidin-Resten bestehenden Schwanz am N-Terminus, wobei die schwach immunogene DHFR das Fusionsprotein während der Expression stabilisiert und seine Antigenität steigert.

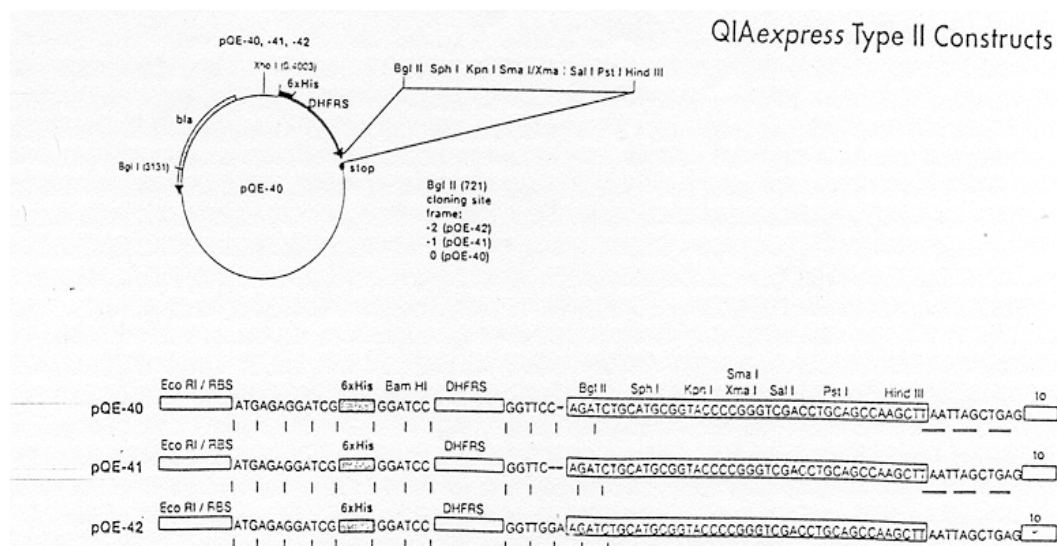


Abb. 1: Schematische Darstellung der pQE-Vektoren (nach Crowe and Henco, 1992)

Eine Einzelkolonie von pQE-Plasmid-tragenden M15pREP4-Zellen wurde in 2 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde 1:4 mit LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) verdünnt und bei 37 °C für weitere 90-120 min geschüttelt. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM)

wurde die Synthese der HaPV-VP1-DHFR-Fusionsproteine induziert. Zur Kontrolle der Induktion der Fusionsproteinsynthese wurden jeweils eine Positivkontrolle (pQE40-transformierte M15pREP4-Zellen mit Zugabe von 1 mM IPTG) und eine Negativkontrolle (Bakterienkultur ohne IPTG-Zugabe) mitgeführt. Durch die Entnahme von Aliquots zu unterschiedlichen Zeiten konnte eine Induktionskinetik verfolgt werden. Die Induktionszeit betrug in der Regel 4 bis 5 Stunden.

2.3.5.2. Lyse der Bakterienzellen

Die Bakteriensuspension wurde 1 min bei 4 °C (12000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in Probenpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2%SDS; 5% 2-Mercaptoethanol und 10% Glycerin) resuspendiert. Nach 4-5 min Vortexen wurde das Lysat im Wasserbad bei 100 °C für 10 min gekocht. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.6. Proteinanalytik

2.3.6.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse und Größenbestimmung wurden Proteine mittels 15%iger SDS-PAGE im diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Vor der SDS-PAGE wurden die Proben in Probenpuffer erhitzt (siehe 2.3.5.2). Nach dem Auftragen der Proben (Probenvolumen: 15-20 µl) wurden die Platten in die vertikale Elektrophoresekammer Protean Ixi (BIO-RAD, München, Deutschland) eingespannt und der Laufpuffer in die Kammer eingefüllt. Zum Einwandern der Proben in das Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 100V gewählt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 200 V (Laufzeit 3,5-4 Stunden)

2.3.6.2. Western Blot-Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen (geblottet). Zum Transfer der Proteine auf den Nitrocellulose-Filter wurde ein Sandwich aus mehreren in verschiedenen Puffern getränkten Filterpapier-Lagen arrangiert. Die erste Lage bestand aus zwei Kathodenpuffer (0,025 M Tris-HCl, pH 9,4; 1.1 % (w/v) Glycin, 20 % (v/v) Methanol) getränkten 3 MM-Filterpapier-Streifen, die auf die untere Elektroden-Platte des Blot-Gerätes gebracht wurden. Es folgte das in Kathodenpuffer equilibrierte Gel. Danach wurde das Gel mit einem der Größe des Gels entsprechenden Blatt Nitrocellulose, das vorher mit bidestilliertem Wasser benetzt worden war, bedeckt. Abschließend folgten zwei in Anodenpuffer I (0,3 mM Tris-HCl, pH 10,4;

10 % Methanol) getränkte 3 MM-Filterpapier-Streifen und zwei in Anodenpuffer II (25 mM Tris-HCl, pH 10,4; 10 % (v/v) Methanol) getränkte 3 MM-Filterpapier-Streifen. Der Transfer erfolgte nach Aufsetzen der oberen Elektrodenplatte für 40 min bei 300 mA. Eine Kontrolle des Transfers war durch reversibles Anfärben der Nitrocellulose in Ponceau-S-Lösung möglich. Der Proteinmarker wurde in Amidoschwarz (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,01 % (w/v) Amidoschwarz) gefärbt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper/Antiseren an die Nitrocellulose zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Transfer 2 Stunden im Blocking-Puffer (5 % Trockenmilch, 0,01 % Natriumazid in PBS/Tween) inkubiert. Für den Nachweis von VP1-abgeleiteten Proteinen wurden polyklonale Kaninchen anti-VP1-Seren und Hamsterseren (siehe 2.1.7) verwendet. Sowohl die polyklonalen Kaninchen-anti-VP1-Seren als auch die Hamsterseren wurden entsprechend der in 2.1.7 angegebenen Verdünnungen eingesetzt und mit einem nativen *E. coli*-Totallysat vorinkubiert. Die Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Bei Verwendung der Hamsterseren wurde der Nitrozellulosefilter nach 3maligem Waschen (PBS-Tween) 4 Stunden mit einem POD-markierten anti-Hamster-Antikörper (1:250 in PBS-Tween) 4 Stunden inkubiert. Nach drei erneuten Waschschritten konnte entwickelt werden. Bei Verwendung der polyklonalen Kaninchen-anti-VP1-Seren wurde die Nitrocellulose nach 3maligem Waschen mit einem Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert (PAP I, DAKO, Dänemark, 1:200, 2 Stunden). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween erfolgte eine Inkubation mit einem Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex (PAP II, DAKO, Dänemark, 1:400, 1 Stunde). Für die Farbreaktion wurde 4-Chloro-1-Naphthol (0,3 % w/v) in Methanol (Sigma, München, Deutschland) als Chromogen in Substratlösung (0,25% v/v H₂O₂; 0,75% w/v NaCl; 0,0028% Triethanolamin, pH 7,5 in H₂O) verwendet. Die Substratreaktion wurde durch Spülen in Wasser gestoppt.

2.3.6.3. Coomassieblau-Färbung

Zum Nachweis von Proteinbanden nach SDS-PAGE wurde das Gel für 2 Stunden in einer Färbelösung [55 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 geschüttelt. Anschließend wurde das Gel unter mehrmaligem Wechseln der Entfärberlösung [10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure] über Nacht entfärbt. Zur Haltbarmachung der Gele konnten diese nach vollständiger Entfernung des überschüssigen Farbreagens getrocknet werden. Hierzu wurden die Gele für eine halbe Stunde in einer Ethanol/Glycerin-Lösung bei Raumtemperatur äquilibriert. Zur Trocknung wurden die Gele zwischen zwei Folien auf Trockenrahmen gespannt. Die Trocknung erfolgte für 1-2 Tage bei Raumtemperatur.

2.3.6.4. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Özel am Robert Koch-Institut (Berlin) durchgeführt. Die Proben wurden zur elektronenmikroskopischen Untersuchung auf dünne, kohleverstärkte Trägernetze aus Kupfer aufgebracht (Grids). Die Untersuchungen der gereinigten Viruspartikeln und der rekombinanten Baculovirus-exprimierten VP1-Derivate erfolgten mittels Negativkontrastierung. Die Negativkontrastierung wurde mit 1 % Uranylacetat durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Elektronenmikroskop EM10A (Zeiss, Deutschland). Es wurden Ausschnittsvergrößerungen von bis zu 1:500000 angefertigt.

2.3.6.5. N-terminale Sequenzierung des viralen VP1

Zur N-terminalen Sequenzierung des viralen VP1 wurden die Virionen durch Zugabe von Probenpuffer denaturiert und im 8 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die VP1-spezifische Proteinbande wurde mit Coomassie blue gefärbt und ausgeschnitten. Die Sequenzierung des N-Terminus des viralen VP1 erfolgte nach der Methode der Edman-Degradation mit einem Gasphasen- Proteinsequenzierer 473A (Applied Biosystems).

2.3.7. Charakterisierung der Baculovirus-exprimierten VP1-Derivate

2.3.7.1. Reinigung der rekombinanten Proteine durch Gradientenzentrifugation

Die Reinigung der HaPV-VP1-Proteine erfolgte nach einer von Kosukegawa et al. (1996) beschriebenen Methode.

Die Insektenzellen wurden 72 Stunden nach Infektion mit den rekombinanten Baculoviren durch Zentrifugation sedimentiert. Das Sediment wurde dreimal mit PBS gewaschen und in Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 100 mM NaCl; 30 mM CaCl₂; 2 mM PMSF) suspendiert und 3mal 4 bis 5 sec mit Ultraschall (bei einer Amplitude von 20 %) behandelt und für 20 min bei 10000 U/min (4 °C) zentrifugiert (Sorvall RC5B; SS34-Rotor). Der Überstand wurde aufbewahrt. Das Sediment wurde in DOC-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 1 % Natriumdesoxycholat, 2 mM PMSF) resuspendiert und 30 min im Eisbad inkubiert. Die Suspension wurde erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Die vereinigten Überstände der beiden Extraktionen wurden für 3 Stunden bei 28000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2ml Aufbewahrungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,9;

100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂) resuspendiert und erneut bei 10000 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden 12 ml einer 20%igen Saccharoselösung (w/v; in Aufbewahrungspuffer) mit 2 ml des Überstandes überschichtet. Die Virus-ähnlichen Partikel wurden durch 4stündige Zentrifugation bei 32000 U/min (Beckman L7-55, SW40-Rotor) sedimentiert. Das Pellet wurde in 2 ml Aufbewahrungspuffer resuspendiert, auf einen Cäsiumchloridgradienten (1,38, 1,35, 1,32, 1,29, 1,26 g/ml in Aufbewahrungspuffer) geschichtet und 16 Stunden bei 32000 U/min (Beckman L7-55, SW40-Rotor) zentrifugiert. Die Fraktionen wurden gesammelt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western blot auf ihre Reaktivität mit einem VP1-spezifischen Serum getestet. Der Nachweis der Partikelbildung erfolgte elektronenmikroskopisch (siehe 2.3.6.4).

2.3.7.2. Untersuchung der DNA-Kontamination von VP1-Partikeln

Zum Nachweis einer möglichen Nukleinsäure-Kontamination von gereinigten VP1-Partikeln wurden diese zuerst mit RNase und DNase bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Nukleasen wurden durch Inkubation bei 70 °C für 10 min inaktiviert. Die Partikel wurden in Gegenwart von 50 µg Proteinase K und 50 µl Proteinase K-Puffer aufgeschlossen. Anschließend wurde das Enzym bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Der Ansatz wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gut gemischt und 3 min in einer Eppendorfschleuse bei 12000 U/min zentrifugiert. Die mögliche DNA-Kontamination in der wässrigen Phase wurde durch Ethanol gefällt und im 0,8 %igen Agarosegel analysiert.

2.3.7.3 Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Baculovirus-exprimierten VP1-Derivate

2.3.7.3.1. mittels Zellfraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung der Insektenzellen wurde nach einer von Schreiber et al. (1989) beschriebenen Methode, mit kleinen Modifikationen, durchgeführt. Zunächst wurden 4×10^6 Insektenzellen mit einer moi von 10 infiziert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation (4000 U/min) für 1 min pelletiert. Das Pellet wurde in 350 µl Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF) langsam resuspendiert und 15 min in Eis inkubiert. Danach wurden 30 µl 10 % NP40 dazugegeben. Die Suspension wurde kräftig gemischt, mit Ultraschall behandelt (Amplitude bei 20%) und bei 4800 U/min für 1 min zentrifugiert. Der Überstand, der die cytoplasmatische Fraktion und RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Das nukleäre Pellet wurde in 100 µl Puffer A resuspendiert, auf 0,5 M Saccharose geschichtet und bei 4800 U/min für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer B (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert und 30 min stark geschüttelt. Der Kernextrakt wurde bei 4800 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (nukleäre Fraktion) wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen.

2.3.7.3.2. mittels Elektronenmikroskopie

Die Insektenzellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und drei Tage bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS abgelöst und 1 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen nach Fixieren mit 2 % Glutaraldehyd in PBS elektronenmikroskopisch untersucht.

2.3.7.4. Stabilität von VP1-abgeleiteten Partikeln

Durch Inkubation mit chelatbildenden Substanzen (EDTA bzw. EGTA) und DTT werden die Kapside der Polyomaviren in subvirale Untereinheiten dissoziiert. Die Stabilität der HaPV-VP1-Partikel sollte mit unterschiedlichen Konzentrationen der chelatbildenden Substanzen und DTT untersucht und elektronenmikroskopisch dokumentiert werden. Dazu wurden die Partikel nach Zusatz von 10 mM EDTA/3 mM DTT bzw. 50 mM EDTA/20 mM DTT bei einer Temperatur von 37 °C für 15 bzw. 16 Stunden inkubiert. Im zweiten Versuch wurden Virus-ähnliche Partikel nach Zusatz von 50 mM EGTA und 20mM DTT bei einer Temperatur von 37 °C für 16 Stunden inkubiert.

2.3.7.5. Quantitative Proteinbestimmung

Bei der quantitativen Bestimmung nach Bradford (1976) wird das sich verschiebende Absorptionsmaximum von Proteinen (von 465 bis zu 595nm) durch die Bindung an den Farbstoff Coomassie Blau ausgenutzt.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS im Bereich von 5 bis 100 µg hergestellt und nach Bradford-Reaktion bei 540 nm die Absorption spektralphotometrisch gemessen. Dazu wurden 100 µl der Proteinlösung mit 900 µl Bradford-Reagenz versetzt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen der Proben gegen einen Leerwert (100 µl PBS + 900 µl Bradford-Reagenz) gemessen. Somit konnten die ermittelten Extinktionswerte der zu untersuchenden Proteinproben mit Hilfe der BSA-Eichkurve in die entsprechenden Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des Kapsids des Hamsterpolyomavirus

3.1.1. Reinigung und elektronenmikroskopische Charakterisierung des Hamsterpolyomavirus

Da es keine geeigneten Zellkulturen für die Vermehrung und Reinigung des HaPV gibt, erfolgte die Isolierung und Reinigung des HaPV aus Hauttumoren von HaPV-infizierten Hamstern wie unter 2.2.1. beschrieben. Die gereinigten Partikel wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen charakterisiert. Mit Hilfe der Negativkontrastierung konnte gezeigt werden, daß die HaPV-Virionen einen Polyomavirus-typischen ikosaedrischen Aufbau zeigen. Der Durchmesser von HaPV beträgt ca. 45 nm (siehe Abb. 4a). Weitergehende Untersuchungen durch Schrägbedampfung offenbarten jedoch, daß das HaPV-Kapsid, im Gegensatz zu den Kapsiden anderer Polyomaviren, eine T=7-laevo Symmetrie besitzt (Abb. 4b und 4c).

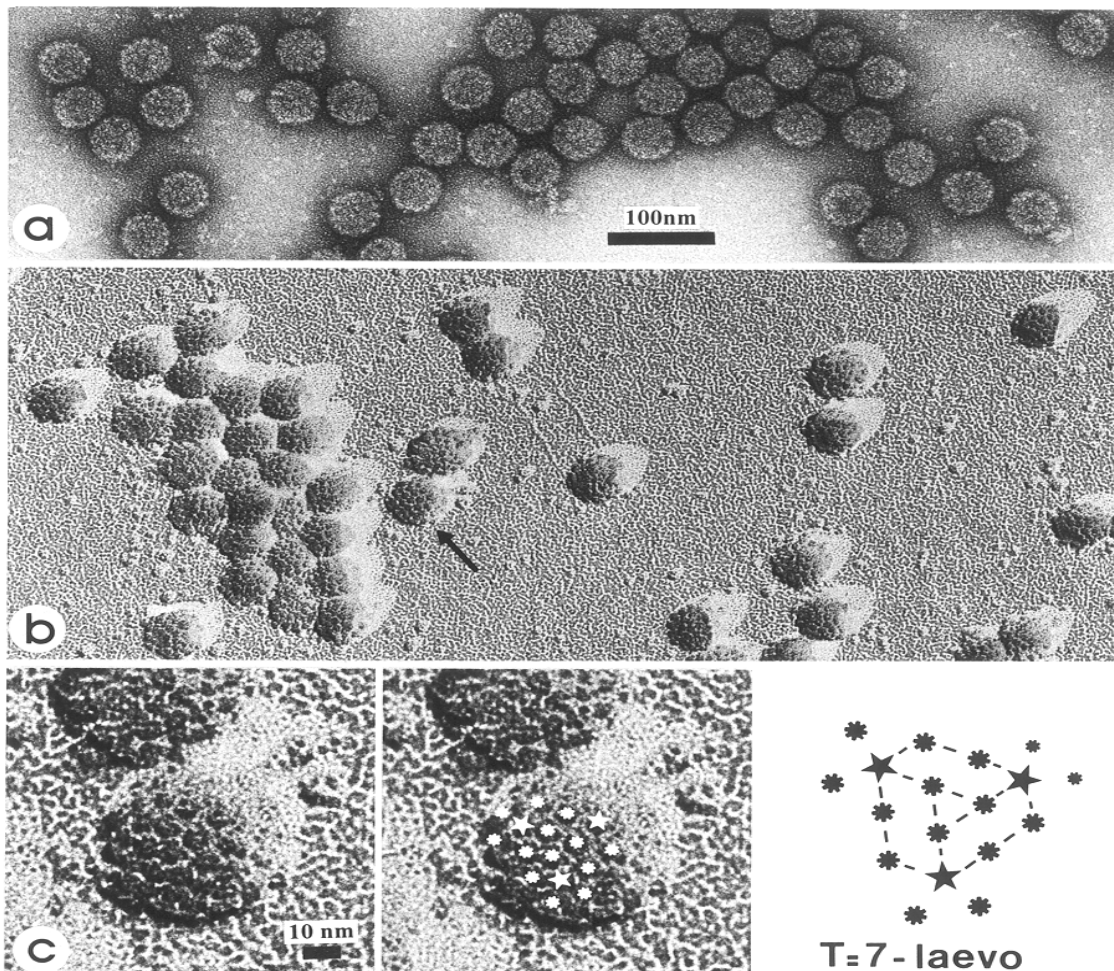


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Darstellung der gereinigten HaPV-Partikel nach Negativkontrastierung mit 1 % Uranylacetat (a), nach Schrägbeschattung (b) und Bestimmung der Virus-Symmetrie als T=7-laevo nach Schrägbedampfung (c)

Vergr. a, b: X 150,000, c: X 500,000, Aufn.: M. Özel (RKI, Berlin)

3.1.2. Analyse der Proteinzusammensetzung des HaPV-Kapsids

Zur Analyse der Proteinzusammensetzung des Viruskapsids wurden die gereinigten Partikel auf ein 15%iges SDS-PAGE aufgetragen. Im Coomassieblau-gefärbten Gel konnten Proteine mit Molekulargewichten (MG) von ca. 42, 36 und 25 kDa nachgewiesen werden (Abb. 5). Das Protein mit einem MG von ca. 42 kDa entspricht dem vorhergesagten MG des putativen VP1, während die zwei anderen Proteine wahrscheinlich die Kapsidproteine VP2 und VP3 darstellen (siehe Tab.4). Die Identität des VP1 konnte durch dessen Reaktivität mit Kaninchen-Seren, die gegen *E. coli*-exprimiertes verkürztes VP1 (AS 29-320 bzw. 133-320) hergestellt worden waren, belegt werden (nicht gezeigt). Im Immunoblot mit Seren von HaPV-infizierten Z3-Hamstern konnten ebenfalls drei Proteine detektiert werden, die in ihren Molekulargewichten den vorhergesagten Proteinen VP1, VP2 und VP3 entsprechen (Abb. 6).

Durch densitometrische Analyse der Proteinzusammensetzung von gereinigten HaPV-Kapsiden konnte gezeigt werden, daß das VP1 das Hauptkapsidprotein darstellt. Das VP1 repräsentiert ca. 71 % der gesamten viralen Kapsidproteine. Neben diesen drei wahrscheinlichen Viruskapsidproteinen wurden in der SDS-PAGE Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten (ca. 15-16 kDa) beobachtet. Diese Proteine könnten zelluläre Histone sein, die assoziiert mit der viralen DNA, in den Viruspartikeln enthalten sind (Abb.5).

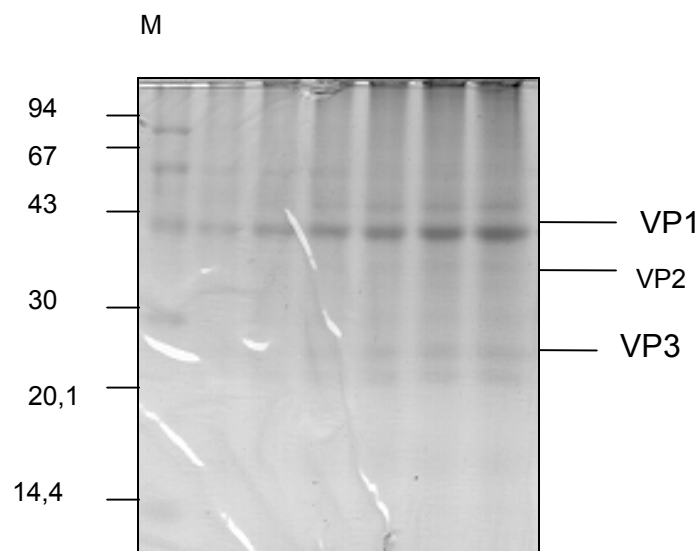


Abb. 5: 15%ige SDS-PAGE von gereinigten HaPV-Partikeln.

Nach Reinigung wurden die Fraktionen, die Viruspartikel enthalten, nach steigender Konzentration der viralen Proteine auf die SDS-PAGE aufgetragen. Die viralen Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 sind durch Pfeile markiert.

M = Molekulargewichtsmarker

Tab. 4: Vorhergesagte und in der SDS-PAGE beobachtete Größen der viralen Kapsidproteine

Virale Proteine	vorhergesagte Länge (in Aminosäuren)	vorhergesagtes MG (in kDa)	beobachtetes MG in der SDS-PAGE (in kDa)
VP1	384, 388*	41,8; 42,4	42
VP2	354	36,6	36
VP3	221	25,6	25

*im VP1-ORF existieren 2 in-frame Translationsinitiationsorte (siehe 3.1.4.).

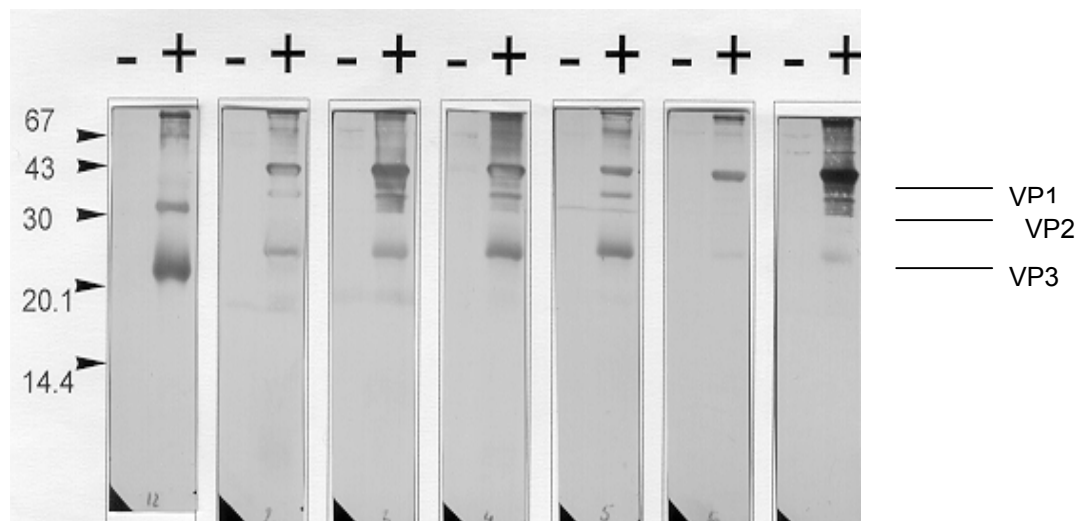


Abb. 6: Nachweis der viralen Strukturproteine im Western Blot mit Seren von Hamsterpolyomavirus-infizierten Z3-Hamstern

–: Leber-Extrakt von HaPV-freien Hamstern; +: Gereinigte Viruspartikel

3.1.3. Bestimmung der N-terminalen Sequenz des viralen VP1

Die Vorhersage des VP1-ORF ergab 2 in-frame befindliche potentielle Translationsinitiationssignale (ATG), die nur durch 3 Kodonen voneinander getrennt sind (Abb.7a). Für die Klonierung und heterologe Expression des VP1 sollte deshalb zunächst die N-terminale Sequenz des authentischen viralen Proteins bestimmt werden. Die Sequenzierung des N-Terminus des viralen VP1 erfolgte nach der Methode der Edman-Degradation (siehe 2.3.6.5.). Die Sequenzierung ergab, daß die Translationsinitiation am 2. ATG des VP1-ORF erfolgt (Abb.7b). Daraus ergibt sich die Synthese eines 384 Aminosäuren langen VP1 (Abb. 7c). Interessanterweise stimmt somit die N-terminale Sequenz vom HaPV-VP1 mit der des VP1 vom murinen Polyomavirus Py überein (nicht gezeigt).

- (a) Met Arg Glu Ser Met Ala Pro Lys Arg Lys Ser
- (b) Ala Pro Lys Lys/Arg Lys Ser

(c)

10	20	30	40	50	60
MAPKRKSGAS	SRCANPCGKP	CPKPANVPKL	IMRGGVGVLD	LVTGEDSITQ	IEAYLNPRMG
70	80	90	100	110	120
QNKPGTGTDG	QYYGFSQSIK	VNSSLTADDEV	KANQLPYYSM	AKIQLPTLNE	DLTCDTLQMW
130	140	150	160	170	180
EAVSVKTEVV	GVGSLLNVHG	YGSRSETKDI	GISKPVEGTT	YHMFVGGGEP	LDLQGLVQNY
190	200	210	220	230	240
NANYEAAIVS	IKTVTGKAMT	STNQVLDPTA	KAKLDKDGRY	PIEIWGPDP	KNENSRYYGN
250	260	270	280	290	300
FTGGTGTTPV	MQFTNTLTTV	LLDENGVGPL	CKGDGLYLSA	ADVMGWYIEY	NSAGWHWRGL
310	320	330	340	350	360
PRYFNVTLRK	RWVKNPYPVT	SLLASLYNNM	LPTIEGQPM	GEAAQVEEVR	IYEGTEAVPG
370	380				
DPDVNRFIDK	YGQQHTKPPA	KPAN.			

Abb. 7: Aminosäuresequenz des HaPV-VP1.

Aus dem Vergleich der vorhergesagten (a) und experimentell bestimmten (b) N-terminalen AS-Sequenz des VP1 wurde die komplette AS-Sequenz des VP1 abgeleitet (c).

3.1.4 Aminosäurehomologie der Kapsidproteine von HaPV zu denen anderer Polyomaviren

Die vorhergesagten Aminosäuresequenzen der Kapsidproteine des HaPV wurden mit denen von anderen Polyomaviren verglichen. Die VP1-Sequenz wurde als die am stärksten konservierte Sequenz zwischen den Polyomaviren gefunden (siehe Tab. 5). Diese große Aminosäuresequenzhomologie widerspiegelt wahrscheinlich die biologische Bedeutung dieses Proteins. Die stärkste Homologie zeigten die 3 HaPV-Kapsidproteine zu den jeweils entsprechenden Proteinen des murinen Polyomavirus Py (Stamm A3).

Tab. 5: Aminosäurehomologie zwischen den späten Proteinen des HaPV und denen anderer Polyomaviren (in %)

Virus	VP1	VP2	VP3
Murines Polyomavirus (A3)	65,5	44,6	45,4
LPV	57,9	36,8	41,0
BFDV	53,9	29,3	32,9
JCV	53,7	29,4	35,6
SV40	50,1	33,8	34,2

3.1.5. Immunologische Reaktivität der HaPV-Proteine mit Seren von HaPV-infizierten Hamstern

Die gereinigten Virusproteine wurden im Western Blot eingesetzt, um die Reaktivität von Seren HaPV-infizierter Z3-Hamster zu untersuchen. Dabei wurde als Negativkontrolle Lebergewebe aus nichtinfizierten HaP-Hamstern benutzt. Zur Untersuchung wurden zwei Gruppen von Seren herangezogen: Seren von Papillom-tragenden Z3-Hamstern und Seren von Z3-Tieren, die keine Papillome trugen (siehe 2.1.6). Mit Ausnahme des Serums I479 reagierten alle eingesetzten Seren der beiden Gruppen mit den Viruskapsidproteinen VP1, VP2 und VP3 (Tab. 6). Während das Serum I479 mit VP1 und VP3 reagierte, wurde keine Reaktivität mit dem VP2-Protein gefunden. Dagegen zeigten die Seren der nichtinfizierten HaP-Hamster keine Reaktivität mit den viralen Proteinen (nicht gezeigt).

Tab. 6: Reaktivität der Hamster-Seren mit HaPV-Strukturproteinen

Serum-Nummer	Papillom	Lebergewebe	VP1	VP2	VP3
33	mit Papillom	-	+++	+	+
I533	mit Papillom	-	+	+	+
I558	mit Papillom	-	+++	+	+
559	mit Papillom	-	+	+	+
486	mit Papillom	-	+	+	+
I479	mit Papillom	-	+	-	+
521	mit Papillom	-	+	+	+
608	mit Papillom	-	+	+	+
31	mit Papillom	-	+++	+	+
581	mit Papillom	-	+	+	+
32	ohne Papillom	-	+	+	+
I531	ohne Papillom	-	+	+	+
I555	ohne Papillom	-	+++	+	+
556	ohne Papillom	-	+++	+	+
I602	ohne Papillom	-	+++	+	+
I607	ohne Papillom	-	+++	+	+
I523	ohne Papillom	-	+++	+	+
502	ohne Papillom	-	+++	+	+
599	ohne Papillom	-	+++	+	+
600	ohne Papillom	-	+	+	+
1	ohne Papillom	-	+++	+	+
616	ohne Papillom	-	+	+	+
617	ohne Papillom	-	+	+	+

+++ = sehr starke Reaktivität

+ = starke Reaktivität

- = keine Reaktivität

3.2 Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln auf der Basis des VP1 vom HaPV

3.2.1. Klonierung der kodierenden Sequenzen für das authentische und ein N-terminal verlängertes VP1 des HaPV in pBacPak9

Für die Subklonierung im Baculovirus-Transferplasmid wurden die beiden Plasmide pFR36-VP1/2-12 und pFR36-VP1/2-9 ausgewählt, die das authentische bzw. das N-terminal verlängerte VP1 kodieren. Die resultierenden Baculovirus-Transferplasmide pBacPak9-VP1(2.ATG) und pBacPak9-VP1(1.ATG) enthalten eine VP1-kodierende Sequenz von 384 bzw. 388 AS, die im Fall des zweiten Plasmids am 5'-Ende um 4 Kodonen verlängert ist.

Die VP1-kodierenden Sequenzen wurden als *Xba*I-Fragmente aus den genannten pFR36- abgeleiteten Plasmiden isoliert und in das *Xba*I-linearisierte Baculovirus-Transferplasmid pBacPak9 umkloniert (Abb.8). Die Insertion und Orientierung der eingebauten Fragmente wurde durch Spaltung mit Restriktionsenzymen anhand der Größe der entstehenden Fragmente bestimmt.

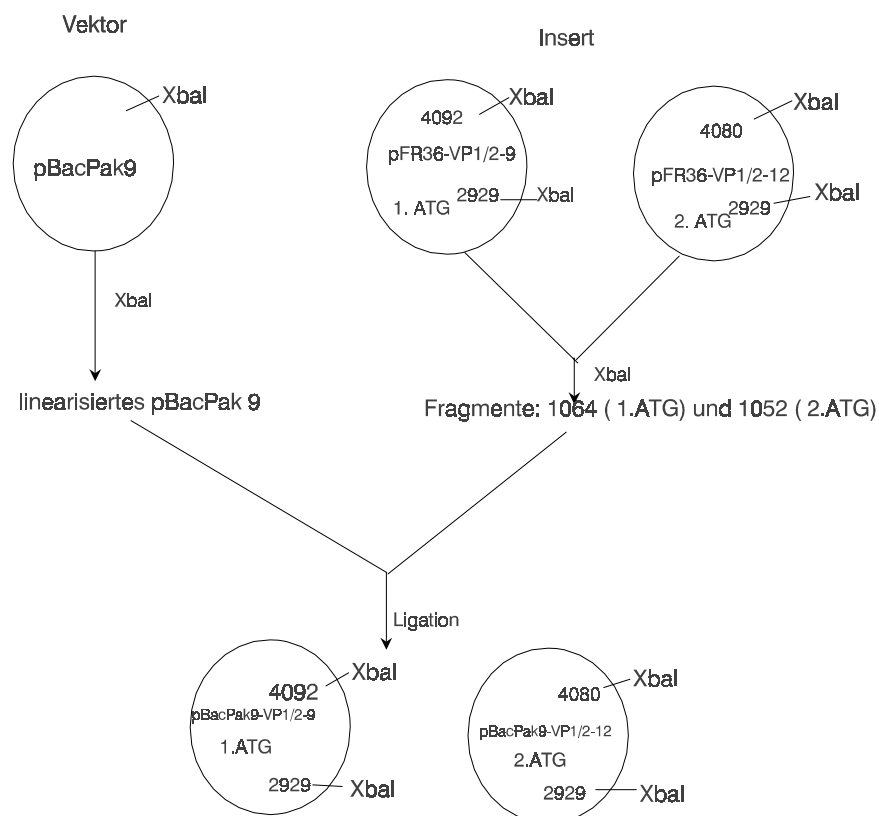


Abb. 8: Herstellung der Baculovirus-Transferplasmide, die das authentische bzw. das N-terminal verlängerte VP1 des HaPV kodieren.

3.2.2. Expression und Antigenität des HaPV-VP1 aus Insektenzellen

Für die Expression von Fremdgenen in Insektenzellen ist es notwendig, daß das Fremdgen durch homologe Rekombination zwischen Baculovirus-DNA und Transfervektor in das Baculovirus-Genom integriert wird. Zu diesem Zweck wurden Sf9-Zellen mittels Lipofectin-Methode mit 1,25 µg der jeweiligen Transfer-Plasmid -DNA [pBacPak9-VP1 (1.ATG) und pBacPak9-VP1 (2.ATG)] und 0,25 µg der Baculo-Gold-DNA cotransfiziert. Drei Tage nach der Infektion wurde der Zellkultur-Überstand geerntet und zur weiteren Infektion von Sf9-Zellen benutzt. Für die Überstände der mit Baculo-Gold und pBacPak9-VP1(1.ATG) bzw. pBacPak9-VP1(2.ATG) cotransfizierten Sf9-Zellen konnte ein Titer von 6×10^7 pfu/ml bzw. 3×10^7 pfu/ml ermittelt werden. In den Totallysaten der entsprechenden Zellen konnten mit Hilfe der SDS-PAGE Proteinbanden mit dem für VP1 erwarteten Molekulargewicht nachgewiesen werden (Abb. 9 Bahnen 5 und 6). Solche Proteinbanden wurden weder in nichtinfizierten Zellen noch in Baculovirus-Wildtyp-infizierten Zellen beobachtet (Bahnen 2 und 3). Im Western blot (Abb. 10a und 10b) entsprachen die Baculovirus-exprimierten VP1-Derivate dem Molekulargewicht des viralen VP1 (ca. 42 kDa; Bahn 4). Die Identität der VP1-Proteinbanden wurde durch die immunologische Reaktivität mit einem Kaninchen-anti-HaPV-VP1(As 29-320)-Serum (Abb. 10a) und mit Seren von HaPV-infizierten Z3-Hamstern (Abb. 10b) belegt.

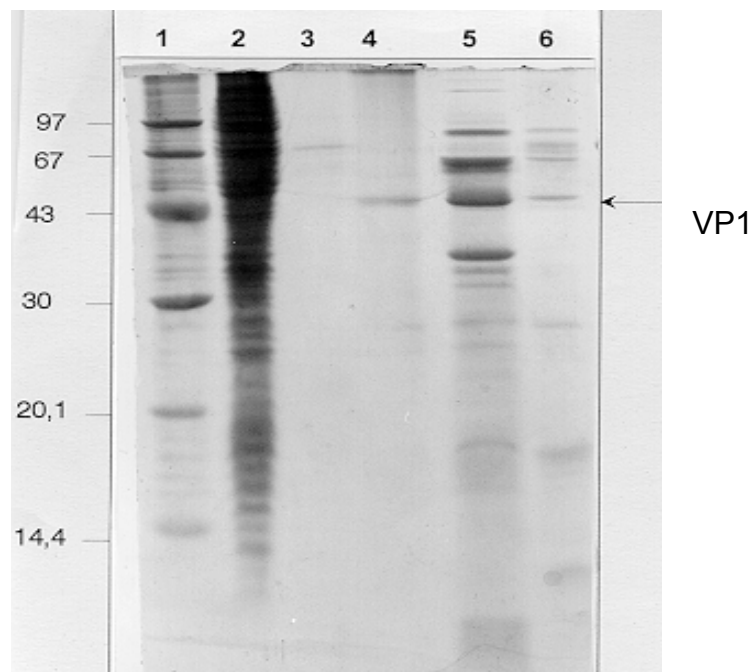


Abb. 9: SDS-PAGE zum Nachweis der HaPV-VP1-Expression in Insektenzellen.

Drei Tage nach Infektion von Sf9-Zellen mit AcNPV-WT (Bahn 3), AcNPV-VP1(2.ATG) (Bahn 5) , AcNPV-VP1 (1.ATG) (Bahn 6) wurden die Totallysate in einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente das virale VP1 (Bahn 4), als Negativkontrolle mock-infizierte Sf9-Zellen (Bahn 2). Molekulargewichtsmarker (Bahn 1).

Sowohl das authentische als auch das N-terminal verlängerte VP1 zeigten eine starke Reaktivität mit Seren von Papillom-tragenden und Papillom-freien Hamstern (Tab.7). Neben der VP1-Bande des erwarteten MG wurden im Zellysat der mit AcNPV-VP1(2.ATG) (authentisches VP1) infizierten Sf9-Zellen im gefärbten Gel als auch im Western blot Proteinbanden mit niedrigerem Molekulargewicht beobachtet (Abb.10a bzw.10b , Bahn 4). Diese Proteine stellen wahrscheinlich Degradationsprodukte des authentischen VP1 dar. Durch die Untersuchung der Expressionskinetik konnte gezeigt werden, daß sowohl das authentische als auch das N-terminal verlängerte VP1 bereits 48 Stunden nach der Infektion im Lysat der exprimierenden Zellen vorliegen. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Expressionsrate zwischen den beiden Proteinen beobachtet (nicht gezeigt)

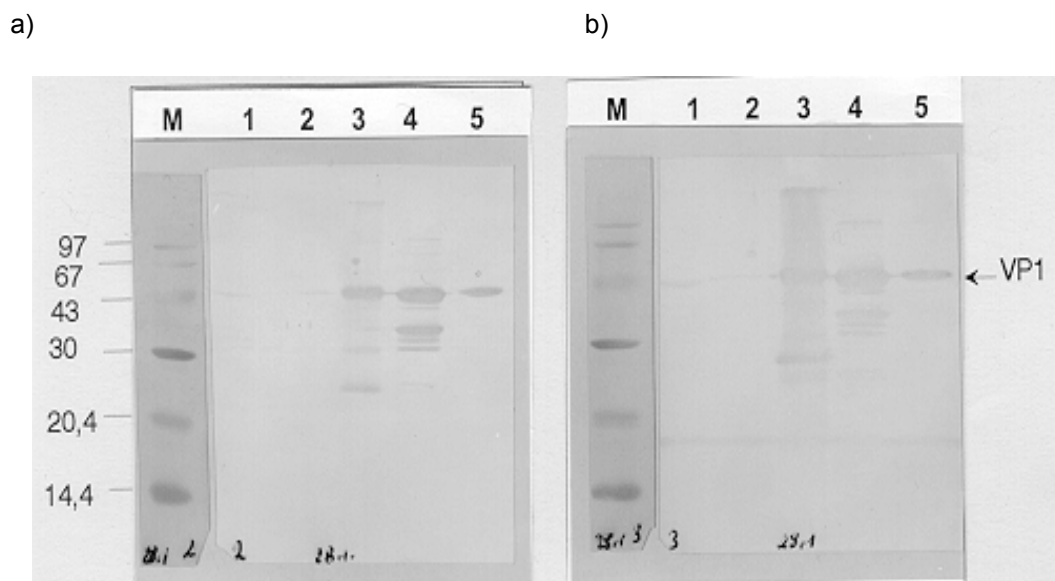


Abb. 10: Reaktivität der Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1-Derivate im Western blot mit Kaninchen-anti-VP1(As 29-320)-Serum (a) und einem anti-VP1-positiven Z3-Hamsterserum (b).

Totallysate von Sf9-Zellen, die mit AcNPV-WT (Bahn 2), AcNPV-VP1(2.ATG) (Bahn 4) und AcNPV-VP1(1.ATG) (Bahn 5) infiziert worden waren, sind in einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet worden. Als Kontrolle dienten virales VP1(Bahn 3) und mock-infizierte Sf9-Zellen (Bahn 1).

Tab. 7: Reaktivität der Baculovirus-exprimierten VP1-Derivate mit Seren von Papillom-tragenden und Papillom-freien Hamstern

Serum-nummer	Leber-gewebe	virales VP1	Baculovirus-exprimiertes N-terminal verlängertes VP1	Baculovirus-exprimiertes authentisches VP1
31	–	+	+	+
33	–	+	+	+
1533	–	+	+	n.t.
1558	–	+	+	+
599	–	+	+	+
486	–	+	(+)	(+)
1479	–	+	(+)	(+)
521	–	+	+	+
608	–	+	+	+
581	–	+	+	+
32	–	+	+	n.t.
1531	–	+	+	+
1555	–	+	(+)	+
556	–	+	+	+
1602	–	+	+	+
1607	–	+	+	+
1523	–	+	n.t.	n.t.
502	–	+	(+)	(+)
1598	–	+	+	+
600	–	+	+	+
1	–	+	+	+
618	–	+	+	+

+ = starke Reaktivität; – = keine Reaktivität

(+) = schwache Reaktivität; n.t. = nicht getestet

3.2.3. Nachweis der Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln in Insektenzellen

Die Bildung von HaPV-VP1-abgeleiteten Virus-ähnlichen Partikeln in Insektenzellen wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht. Dazu wurden 3×10^8 Insektenzellen mit einer moi von 10 mit den rekombinanten Baculoviren infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Insektenzellen aufgeschossen und die löslichen Proteine mit Hilfe eines Cäsiumchlorid-Gradienten fraktioniert (siehe 2.3.7.1). Sowohl für das authentische als auch für das N-terminal verlängerte VP1 konnte die Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln gezeigt werden (Abb. 11a bzw. 11b). Die Virus-ähnlichen Partikel besitzen eine Größe von 45 nm und eine Dichte von 1,29-1,30 g/ml. Im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten wurden neben den Virus-ähnlichen Partikeln in geringerer Menge auch tubuläre Strukturen gefunden (siehe Abb. 11a).

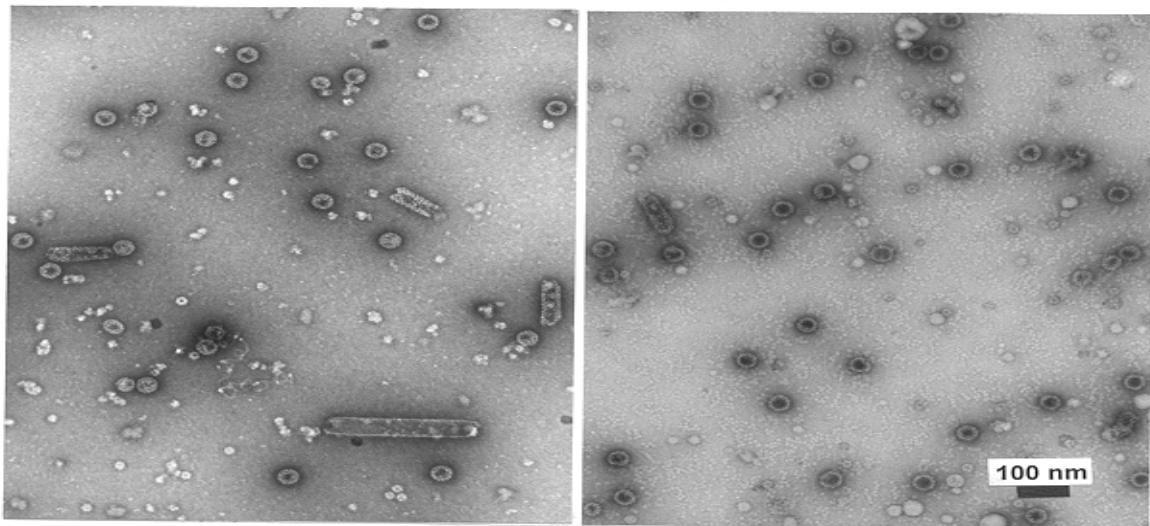


Abb.11: Elektronenmikroskopische Darstellung von gereinigten Virus-ähnlichen Partikeln, die von authentischem VP1 (a) und N-terminal verlängertem VP1 (b) gebildet wurden.

Vergr.: x 60,000, Aufn.: M. Özel (RKI, Berlin)

3.2.4. Untersuchungen zur Stabilität und zu einer möglichen Kontamination der Virus-ähnlichen Partikel mit Nukleinsäure

Die Stabilität der VP1-abgeleiteten VLPs wurde durch mehrstündige Inkubation mit 10 mM EDTA/3 mM DTT bzw. 50 mM EDTA/20 mM DTT untersucht. In beiden Experimenten konnte keine Dissoziation der Partikel in Kapsomere beobachtet werden (Abb. 12a bzw. 12b). Dagegen wurden VP1-abgeleitete VLPs durch Zusatz von 50 mM EGTA und 20 mM DTT bei 37 °C für 16 Stunden partiell in Pentamere dissoziiert (Abb. 12c bzw. 12d)

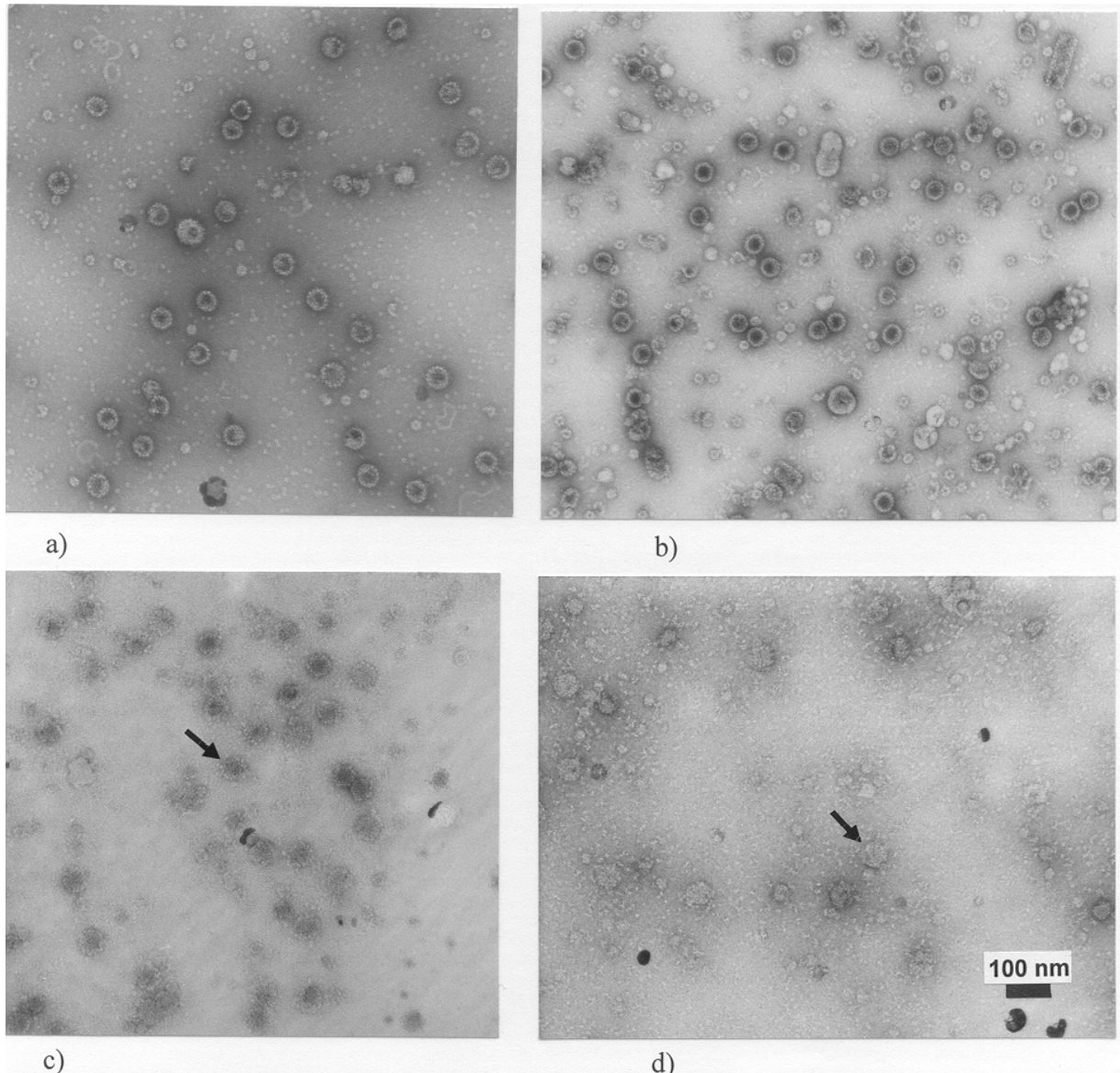


Abb.12: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Stabilität der VP1-Partikel

a: authentisches VP1/50 mM EDTA + 20 mM DTT

b: N-terminal verlängertes VP1/50 mM EDTA+20 mM DTT

c: authentisches VP1/50 mM EGTA + 20 mM DTT

d: N-terminal verlängertes VP1 /50 mM EGTA+ 20 mM DTT

Vergr.: x 6 60,000. Pentamere sind durch Pfeile markiert. Aufn.: M. Özel (RKI, Berlin)

Zur Bestimmung einer möglichen DNA-Kontamination wurden die VP1-Partikel durch Proteinase K-

Behandlung aufgeschlossen, Phenol-Chloroform extrahiert und eventuell vorhandene DNA Ethanol-präzipitiert und im Agarosegel analysiert. Während in Partikeln, die vom N-terminal verlängerten VP1 gebildet wurden, keine Nukleinsäure-Kontamination nachgewiesen werden konnte, wurde in vom authentischen VP1 gebildeten Partikeln enkapsidierte Nukleinsäure mit einer Größe von ungefähr 5 kb nachgewiesen (Abb. 13 Bahn 2).

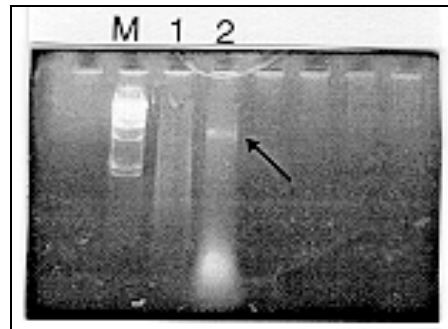


Abb.13: Untersuchung der DNA-Kontamination von gereinigten VP1-abgeleiteten Partikeln im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

Es wurden VLPs, die von N-terminal verlängertem VP1 (Bahn 1) und authentischem VP1 (Bahn 2) gebildet wurden, aufgetragen.

M: Molekulargewichtsmarker λ HindIII,

3.2.5. Kreuzreaktivität der *Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1-Derivate mit gegen andere Polyomaviren gerichteten Antiseren*

Für die Anwendung HaPV-VP1-abgeleiteter VLPs in Gentherapie und Vakzineentwicklung könnte deren Kreuzreaktivität mit dem VP1 anderer Polyomaviren von Bedeutung sein. Für die Untersuchung der Kreuzreaktivität des Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1 mit anderen Polyomaviren wurden Kaninchenserum verwendet, die gegen SV40 (Abb. 14), JCV-VP1 (Abb.15), LPV-VP1 und murines Polyomavirus (nicht gezeigt) hergestellt worden waren. Alle genannten Seren zeigten im Western blot eine starke immunologische Reaktivität mit beiden HaPV-VP1-Derivaten (Tab 8).

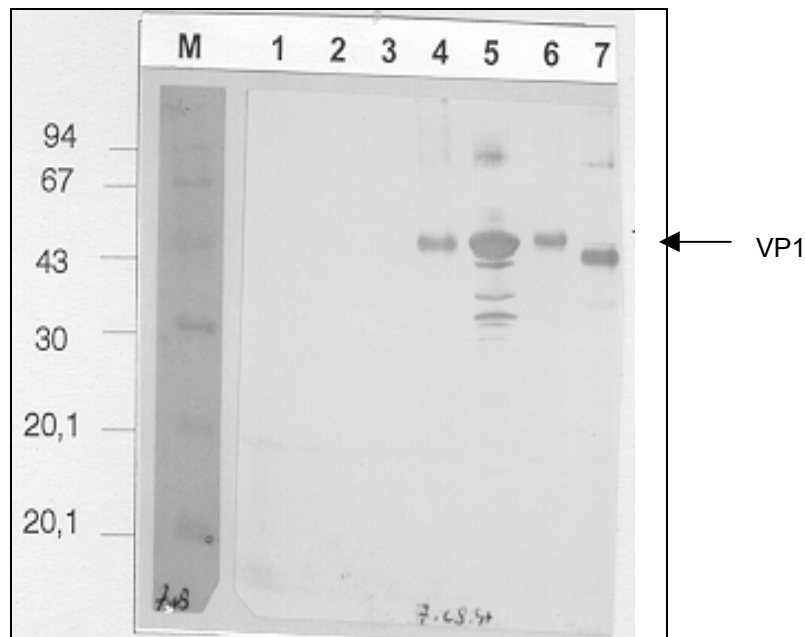


Abb.14: Nachweis der Kreuzreaktivität von Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1-Derivaten mit anti-SV40-Serum.

Totallysate von Sf9-Zellen, die mit AcNPV-WT (Bahn 3), AcNPV-VP1(2.ATG) (Bahn 5), AcNPV-VP1(1.ATG) (Bahn 6) infiziert worden waren, wurde in einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurden aufgetragen: Lebergewebe von nichtinfizierten HaP-Hamstern (Bahn 1), HaPV-Viruslysate (Bahn 4), Baculovirus-exprimiertes LPV-VP1 (Bahn 7) und nicht-infizierte Sf9-Zellen (Bahn 2).

M: Proteinmarker

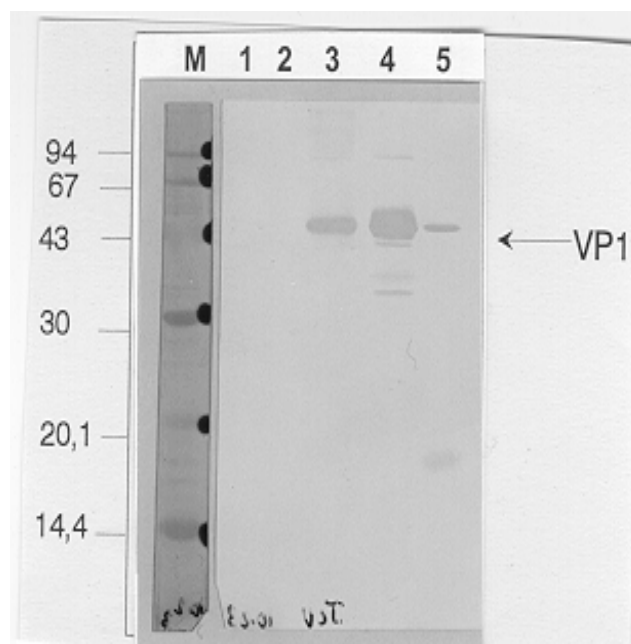


Abb.15: Western blot-Reaktivität des Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1 mit einem anti-JCV-VP1-Serum.

Totallysate von Sf9-Zellen, die mit AcNPV-WT (Bahn 2), AcNPV-VP1(2.ATG) (Bahn 4), AcNPV-

VP1(1.ATG) (Bahn 5) infiziert worden waren, wurde in einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurden HaPV-Viruslysate (Bahn 3) und nicht-infizierte Sf9-Zellen (Bahn 1) aufgetragen.

M: Proteinmarker

Tab. 8: Kreuzreaktivität von viralem und Baculovirus-exprimiertem VP1 des HaPV mit anti-SV40, anti-JCV-VP1, anti-LPV-VP1, und anti-murines Polyomavirus-Seren

Antigene	Kaninchen anti-SV40	Kaninchen anti-JCV-VP1	Kaninchen anti-LPV-VP1	Kaninchen anti-murines Polyomavirus
nicht-infizierte Sf9-Zellen	–	–	–	–
AcNPV-WT	–	–	–	–
Virales VP1	+	+	+	+
BaculoVP1 (2.ATG)	+	+	+	+
BaculoVP1 (1.ATG)	+	+	+	+

– = keine Reaktivität

+ = starke Reaktivität

3.2.6. Subzelluläre Lokalisation des Baculovirus-exprimierten HaPV-VP1 in Insektenzellen

3.2.6.1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation

Im Replikationszyklus der Polyomaviren wird das Hauptkapsidprotein nach seiner Synthese im Cytoplasma zum Kern transportiert, um dort durch Enkapsidierung der viralen DNA assembliert zu werden (siehe 1.5). Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der in Insektenzellen exprimierten Hauptkapsidprotein-derivate des HaPV wurden die Insektenzellen mit einer MOI von 10 infiziert und drei Tage bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach Fixieren mit 2% Glutaraldehyd elektronenmikroskopisch untersucht. Als Kontrollen wurden mock- und Baculovirus-(WT)-infizierte Insektenzellen in gleicher Weise behandelt und untersucht. Während in Insektenzellen, die das authentische oder das N-terminal verlängerte VP1 des HaPV exprimieren, Virus-ähnliche Partikel im Zellkern nachgewiesen werden konnten (Abb.16c und d), wurden in den Kontrollzellen solche Partikel nicht beobachtet (Abb.16a und b). Während jedoch das N-terminal verlängerte VP1 hauptsächlich im Zellkern gefunden wurde (Abb.16d), wurden in den Zellen, die das authentische VP1 exprimieren, nur wenige Partikel im Zellkern beobachtet (Abb.16c).

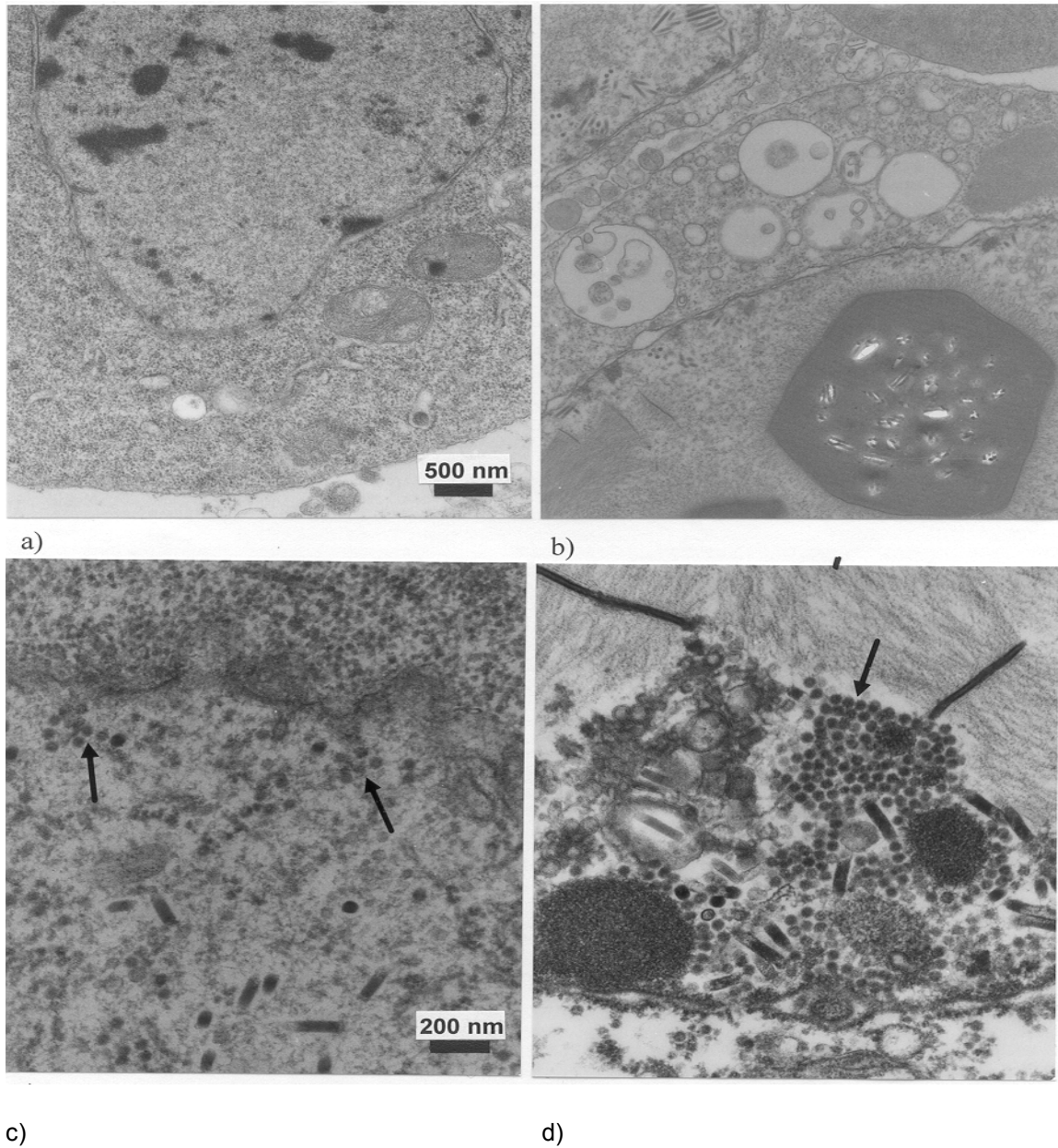


Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation von HaPV-VP1 in Insektenzellen.

a: nicht-infizierte Insektenzelle

b: Wildtyp-infizierte Insektenzelle

c: AcNPV-VP1(2.ATG)-infizierte Insektenzelle

d: AcNPV-VP1(1.ATG)-infizierte Insektenzelle

VP1-Partikel sind durch Pfeile markiert. Aufn.: M. Özel (RKI, Berlin)

Vergr.: a, b: x 14,000; c, d: x 40,000

3.2.6.2. Zellfraktionierung zum Nachweis der subzellulären Lokalisation

Die subzelluläre Fraktionierung der Insektenzellen erfolgte nach einer Standardmethode (siehe 2.3.7.3.1). Die einzelnen Zellkompartimente (Cytoplasma und Kern) wurden anschließend im Western blot mit einem HaPV-VP1-spezifischen Kaninchenserum auf das Vorhandensein von VP1 untersucht (Abb. 17). Sowohl das authentische als auch das N-terminal verlängerte VP1 des HaPV wurden in den jeweiligen nukleären Fraktionen nachgewiesen (Bahnen 5 und 7). Dagegen konnte keine Proteinbande mit entsprechendem Molekulargewicht in den cytoplasmatischen Fraktionen festgestellt werden (Bahnen 4 und 6). Als Negativkontrollen wurden cytoplasmatische und nukleäre Fraktionen von nicht-infizierten Insektenzellen (mock) verwendet (Bahnen 2 und 3).

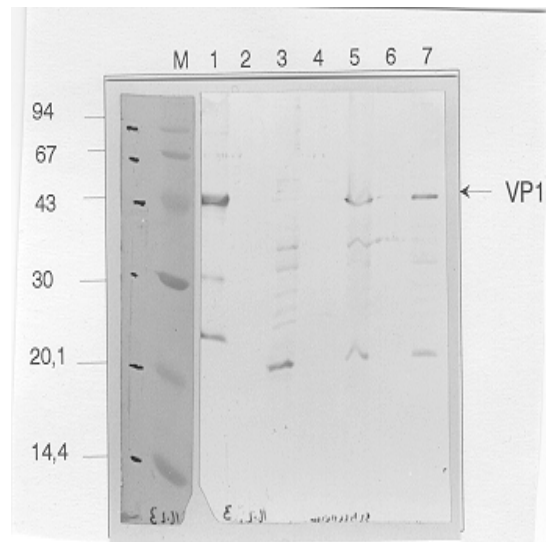


Abb. 17 Western blot zum Nachweis der subzellulären Lokalisation des VP1 in den Insektenzellen mit Kaninchen-anti-HaPV-VP1-Serum.

C = Cytosolfraktion, N = Nuklearfraktion

In einem 15 % SDS-PAGE wurden Cytosolfraktion (C) und Nuklearfraktion (N) von nicht-infizierten (C: Bahn 2; N: Bahn 3), von AcNPV-VP1(2.ATG)-infizierten (C: Bahn 4; N: Bahn 5) und von AcNPV-VP1 (1.ATG)-infizierten Sf9-Zellen (C: Bahn 6; N: Bahn 7) aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde HaPV-Lysat aufgetragen (Bahn 1).

M: Proteinmarker

3.3. Ermittlung potentieller Insertionsorte für Fremdsequenzen im HaPV-VP1 durch Epitopmapping

3.3.1. Kartierung von Epitopen mit Hilfe rekombinanter HaPV-VP1-Proteine

3.3.1.1. Subklonierung der HaPV-VP1-kodierenden Fragmente in pQE-Vektoren

Für das Epitopmapping wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt:

Rekombinante *E. coli*-exprimierte VP1-DHFR-Fusionsproteine und überlappende synthetische Peptide (siehe 3.3.2).

Das Ausgangsplasmid für die Isolierung der kompletten VP1-kodierenden Sequenz von HaPV war das Plasmid pBacPak9-VP1(2.ATG). Durch die *Bgl*II-*Pst*I-Spaltung wurde ein 1152bp langes DNA-Fragment (authentisches VP1) erhalten, das in das *Bgl*II-*Pst*I-gespaltene und Phosphatase-behandelte Plasmid pQE 41 inseriert wurde.

Für die Herstellung von verkürzten Varianten von VP1 wurden 2 experimentelle Ansätze gewählt (Abb.18):

1. Direkte Klonierung von kürzeren VP1-kodierenden DNA-Fragmenten in pQE-Vektoren des entsprechenden Leserahmens.
2. Einführung von Deletionen in pQE-VP1 (As 1-384) durch die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und anschließende Religation.

Die Plasmide pQE-VP1 (As 133-384), pQE-VP1 (As 1-133) und pQE-VP1 (As 320-384) wurden durch direkte Klonierung der entsprechenden Fragmente konstruiert. Nach *Bam*HI-Spaltung des Plasmids pFR36-VP1/2-12 wurde ein 397 bp großes Fragment von pQE-VP1 (As 1-133) isoliert und in den *Bgl*II-gespaltenen, Phosphatase-behandelten Vektor pQE41 inseriert. Das zu klonierende 753 bp große Fragment von pQE-VP1 (As 133-384) wurde aus dem Plasmid pFR36-VP1/2-12 durch *Bam*HI-*Sal*I Spaltung gewonnen und in den *Bgl*II-*Sal*I-gespaltenen, Phosphatase-behandelten Vektor pQE40 inseriert. Das 192bp Fragment von pQE41-VP1(As 320-384) wurde aus dem Plasmid pQE-VP1(As 133-384) durch *Hind*III-Spaltung isoliert und in den *Hind*III-gespaltenen, Phosphatase-behandelten Vektor pQE41 inseriert. Das Plasmid pQE-VP1 (As 29-320) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Ulrich Verfügung gestellt.

Das Plasmid pQE-VP1 (As 133-320) wurde aus pQE-VP1 (As 133-384) durch *HindIII*-Spaltung und anschließende Religation hergestellt. Die Klonierung des Plasmids pQE-VP1 (As 1-320) wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde das Plasmid pQE-VP1 (As 1-133) mit *HindIII* gespalten. Das zu klonierende 873 bp große Fragment wurde aus dem Plasmid pQE-VP1(As 29-320) durch *HindIII*-Spaltung gewonnen und in das mit *HindIII*- gesplante Plasmid pQE-VP1 (As 1-133) inseriert.

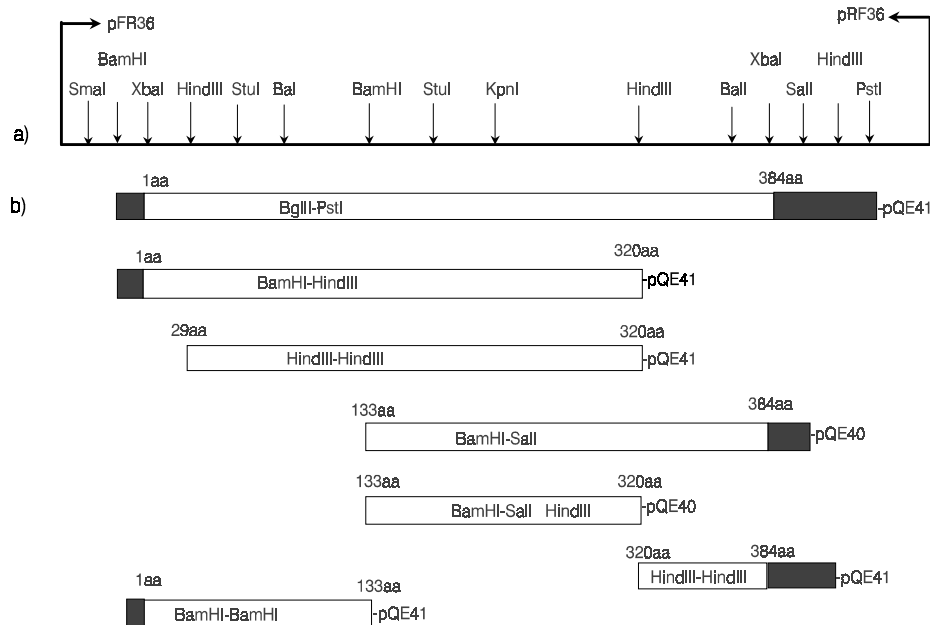
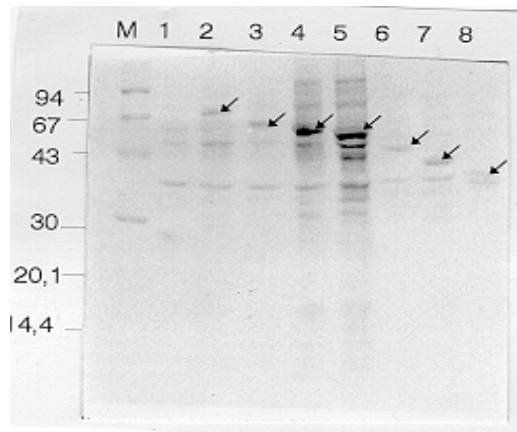


Abb.18: Restriktionskarte der VP1-kodierenden Region (a) und schematische Darstellung der pQE-Expressionsvektoren mit den entsprechenden VP1-kodierenden Fragmenten (b).

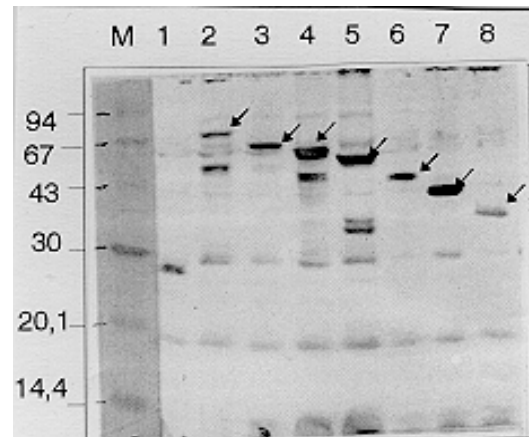
3.3.1.2. Expression rekombinanter HaPV-Proteine in *E. coli*

Die Expression der rekombinanten Fusionsproteine wurde in *E. coli*-Zellen des Stammes M15pREP4 (Villarejo und Zabin, 1974) durchgeführt. Die Synthese der DHFR-VP1-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkultur induziert. Durch Aufnahme einer Induktionskinetik konnte gezeigt werden, daß nach 5stündiger Induktion eine hohe Expression der Fusionsproteine, insbesondere für verkürzte Derivate von VP1, erreicht wurde (nicht gezeigt). Alle pQE-abgeleiteten DHFR-VP1-Fusionsproteine wurden hoch exprimiert und besaßen die erwarteten Molekulargewichte (Abb.19a, Bahnen 2-8). Als Kontrolle für die Induktion wurden pQE40-transformierte M15pRep4-Zellen verwendet (Bahn 1). Die von pQE40 synthetisierte Dihydrofolatreduktase wurde beim erwarteten Molekulargewicht von ca. 22 kd gefunden (Bahn 1). Die DHFR-Fusionsproteine der erwarteten Molekulargewichte reagierten im Western blot mit einem MRGS-His₆-spezifischen monoklonalen Antikörper und dem Serum eines Papillom-tragenden Hamsters (Abb. 19b, Bahnen 2-8; Abb. 19c, Bahnen 4-10). Die Spezifität der Antikörperreaktion wurde durch die fehlende Reaktion der pQE40-exprimierten DHFR erbracht.

a)



b)



c)

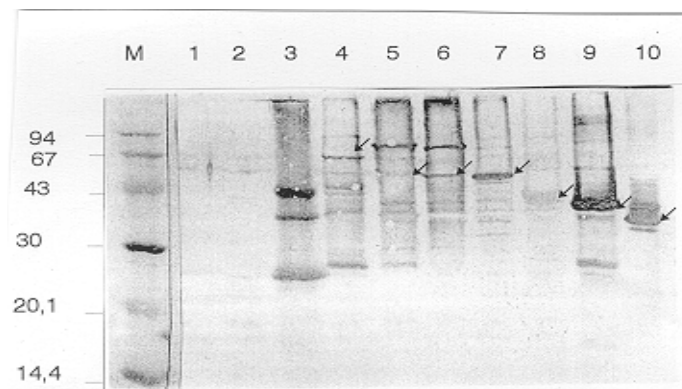


Abb.19: Nachweis der Expression der HaPV-VP1-DHFR-Fusionsproteine im gefärbten SDS-PAGE (a) und durch Western blot mit MRGS-His₆-spezifischem monoklonalen Antikörper (b) und dem Serum eines HaPV-infizierten Z3-Hamsters (c).

Totallysate von M15pREP4-Zellen, die mit pQE40 (1) und den rekombinanten pQE-Plasmiden pQE-VP1 (As 1-384) (Bahn 2), pQE-VP1 (As 1-320) (Bahn 3), pQE-VP1(As 29-320) (Bahn 4), pQE-VP1 (As 133-384) (Bahn 5), pQE-VP1 (As 133-320) (Bahn 6), pQE-VP1 (As 1-133) (Bahn 7) und pQE-VP1 (As 320-384) (Bahn 8) transformiert worden sind, wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt.

Die DHFR-Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

M: Proteinmarker.

3.3.1.3. Epitopmapping im VP1 des HaPV mit Hilfe der rekombinanten Fusionsproteine

Die Untersuchungen zum Epitopmapping wurden mit Hilfe von *E. coli*-Totallysaten der entsprechenden Expressionsklone durchgeführt. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Um mögliche durch unterschiedliche Expression der einzelnen Klone bedingte Reaktivitätsunterschiede der rekombinanten Proteine zu vermeiden, wurden die Proteinkonzentrationen angeglichen. Dazu wurde in der SDS-PAGE die Menge der Fusionsproteine verglichen und durch Einsetzen veränderter Totallysatmengen angeglichen.

Die folgenden Seren wurden für die Kartierung von Epitopen im VP1 eingesetzt.

- Kaninchen-anti-VP1 (As 29-320) - und -anti-VP1 (As 133-320)-Seren
- 10 Seren von Papillom-tragenden Hamstern
- 19 Seren von Papillom-freien, anti-VP1-positiven Hamstern

3.3.1.3.1. Die Reaktivität der rekombinanten Proteine mit HaPV-VP1-spezifischen Kaninchenseren

Zwei Kaninchenseren, die durch Immunisierung mit *E. coli*-exprimierten TrpE-VP1 (As 133-320) - und DHFR-VP1 (As 29-320)-Fusionsproteinen erhalten worden waren (Ulrich et al., 1996; Siray et al., 1998), sind für die Kartierung von Epitopen im VP1 verwendet worden (Siehe Tab. 9). Alle rekombinanten Proteine mit Ausnahme des von pQE-VP1 (As 320-384) exprimierten Proteins wurden vom Kaninchen-anti-VP1 (As 29-320)-Serum erkannt. Das anti-VP1 (As 133-320)-Serum erkannte die rekombinanten Proteine, die von pQE-VP1 (As 1-384), pQE-VP1 (As 1-320), pQE-VP1 (As 29-320), pQE-VP1 (As 133-320) und pQE-VP1 (As 133-384) synthetisiert wurden. Dagegen wurden keine Reaktivität mit den Regionen As1-133 und As 320-384 beobachtet. Somit reagierten beide Seren nur mit den Regionen, die für die Immunisierung der Kaninchen verwendet worden waren. Aufgrund des Reaktivitätsmusters des Kaninchen-anti-VP1 (As 29-320)-Serums mit den rekombinanten Proteinen konnten zwei antigene Regionen identifiziert werden: Ein Epitop liegt im N-terminalen Drittel des VP1 (As 1-133) und ein zweites Epitop liegt im zentralen Teil des VP1 (As 133-320).

Tab.9: Reaktivität der rekombinanten VP1-Proteine mit HaPV-VP1-spezifischen Kaninchenserum

Rekombinante Proteine	Serum	
	Kaninchen-anti-VP1 (As 29-320)	Kaninchen-anti-VP1 (As 133-320)
Lebergewebe-Kontrolle	-	-
DHFR	-	-
virales VP1	+	+
VP1(As 1-384)	+	+
VP1(As 1-320)	+	+
VP1(As 29-320)	+	+
VP1(As 133-384)	+	+
VP1(As 133-320)	+	+
VP1(As 1-133)	+	-
VP1(As 320-384)	-	-

– = keine Reaktivität

+ = starke Reaktivität

3.3.1.3.2 Die Reaktivität der rekombinanten Proteine mit Seren von HaPV-infizierten Z3-Hamstern

Neben der Kartierung von Epitopen im VP1 war auch von Interesse, mögliche Unterschiede in der Epitopspezifität der Antikörperantwort in Papillom-tragenden und Papillom-freien HaPV-infizierten Z3-Hamstern zu untersuchen. Die Serumpools von Papillom-tragenden und Papillom-freien Z3-Hamstern reagierten mit allen rekombinanten VP1 Proteinen. Anschließend wurden die 10 Seren der Papillom-tragenden Z3-Hamster einzeln getestet (Tab.10). Alle Seren der Papillom-tragenden Z3-Hamster reagierten mit den rekombinanten Proteinen VP1 (As 1-384), VP1 (As 133-384) und VP1 (As 320-384). Dagegen wurden die N-terminalen Segmente As 1-320 und As 1-133 nur von 6 bzw. 4 der 10 getesteten Seren erkannt. Auch nur 6 der 10 Seren erkannten die mehr C-terminal lokalisierten Abschnitte As 29-320 und As 133-320.

Zur Charakterisierung der Epitopspezifität der Antikörper von Papillom-freien Z3-Hamstern wurden 14 der 19 Seren ausgewählt (Tab.11). Das komplette VP1 und seine C-terminalen Teile As 133-384 und As 320-384 reagierten mit allen 14 Seren der Papillom-freien Tiere. Die C-terminale Deletion des VP1 führte zu einer Reduktion der Reaktivität. Die rekombinanten Proteine As 1-320 und As 1-133 wurden nur durch 8 (von 12) bzw. 9 (von 14) Seren erkannt. Die zentrale Region des VP1 (As 29-320 und As 133-320) wurde von 10 bzw. 9 Seren (von 14) erkannt.

Tab. 10: Reaktivität der rekombinanten VP1-Proteine mit Seren von Papillom-tragenden Z3-Hamstern

Rekombinante Proteine	Seren									
	33	559	479	31	486	581	608	521	1533	1558
Lebergewebe	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
DHFR	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
virales VP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP1 (As 1-384)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP1 (As 1-320)	(+)	–	–	(+)	+	+	+	–	–	+
VP1 (As 29-320)	+	–	–	(+)	+	+	+	–	–	+
VP1 (As 133-384)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP1 (As 133-320)	(+)	–	–	(+)	+	+	+	–	–	+
VP1 (As 1-133)	(+)	–	–	–	(+)	(+)	–	–	–	+
VP1 (As 320-384)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = starke Reaktivität; (+) = schwache Reaktivität
 – = keine Reaktivität

Tab. 11: Reaktivität der rekombinanten Proteine mit Seren von Papillom-freien Z3 Hamstern

Rekombinante Proteine	Seren													
	1	502	618	523	457	555	607	531	582	602	595	556	599	617
Lebergewebe	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
virales VP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DHFR	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
VP1 (As 1-384)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP1 (As 1-320)	+	+	n.t.	+	+	–	+	+	–	(+)	+	–	n.t.	–
VP1 (As 29-320)	+	+	+	+	+	+	+	–	–	(+)	(+)	–	+	–
VP1 (As 133-384)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP1 (As 133-320)	+	+	–	+	+	–	–	(+)	–	(+)	+	–	+	+
VP1 (As 1-133)	+	+	–	+	+	–	–	+	–	+	+	–	(+)	(+)
VP1 (As 320-384)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = starke Reaktivität

(+) = schwache Reaktivität

– = keine Reaktivität

n.t. = nicht getestet

3.3.1.3.3. Kartierung einer kreuzreaktiven Region des Polyomavirus-VP1

Zur Kartierung der kreuzreaktiven Region im HaPV-VP1 wurden SV40- und JCV-VP1- spezifische Kaninchenserum verwendet. Die rekombinanten Proteine VP1 (As 1-384), VP1 (As 133-384) und VP1 (As 320-384) wurden von beiden Kaninchen-Seren erkannt. Somit konnte eine kreuzreaktive Region am C-terminus des HaPV-VP1 (As 320-384) lokalisiert werden. Sowohl die N-terminale (As 1-133) als auch die zentrale Region des HaPV-VP1 wurden von beiden Seren nicht erkannt.

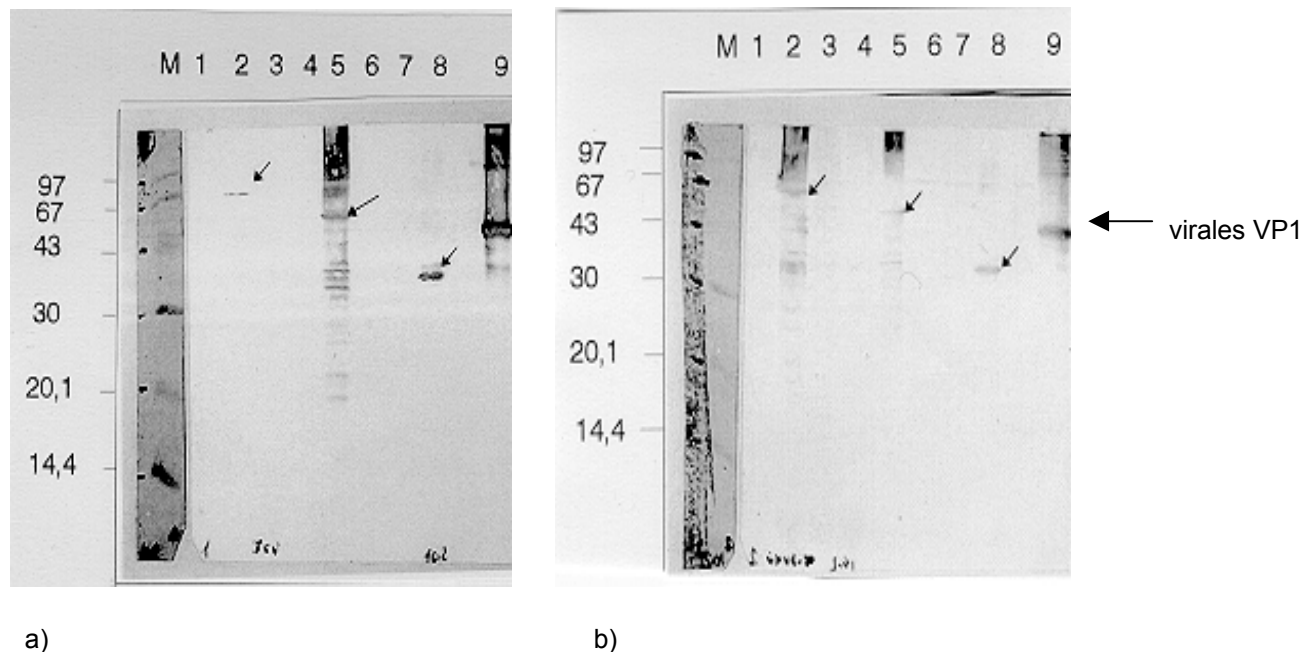


Abb. 20: Reaktivität der rekombinanten HaPV-VP1-Proteine mit Kaninchen-anti-SV40-Serum (a) und Kaninchen-anti-JCV-VP1-Serum (b).

3.3.2. Epitopmapping im VP1 des HaPV mit Hilfe von synthetischen Peptiden

Als alternative Methode der Epitopkartierung wurde eine Pepscan-Analyse verwendet. Das VP1 des HaPV, das aus 384 AS besteht, wurde mit der Methode des Pepscan unter Verwendung von 13meren Peptiden (Verschiebung um 2As) untersucht. Für die Kartierung von Epitopen im VP1 mit Hilfe der synthetischen Peptide wurden die folgenden Seren verwendet:

- Kaninchen-anti-VP1(As 29-320) -Serum
- Serumpool von Papillom-tragenden Hamstern
- Serumpool von Papillom-freien Hamstern
- Serumpool von HaPV-freien, VP1-negativen HaP-Hamstern.

3.3.2.1. *Reaktivität der synthetischen Peptide mit Kaninchen anti-HaPV-VP1-Serum*

Für diese Untersuchungen wurde ein Kaninchenserum verwendet, das durch Immunisierung mit einem rekombinanten, denaturierten VP1 (As 29-320) hergestellt worden war. Die Antikörper in diesem Serum erkannten im Pepscan die Sequenz SRSETKDIGISKPVEGT (Abb. 21). Diese Sequenz wird durch die VP1-Peptide 78 (SRSETKDIGISKP), 79 (SETKDIGISKPVE) und 80 (TKDIGISKPVEGT) repräsentiert. Als Konsensusmotiv läßt sich die Sequenz TRDIGISKP extrahieren. Diese Sequenz ist im VP1 zwischen den Aminosäuren 147 und 155 lokalisiert.

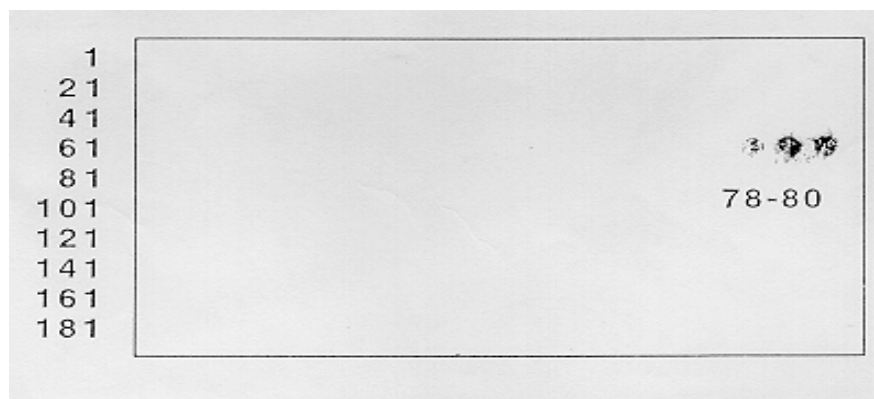


Abb. 21: Reaktivität der VP1-Peptide mit Kaninchen-anti-HaPV-VP1-Serum im Pepscan. Die kontinuierlichen B-Zell-Epitope des VP1 wurden an Cellulose gebunden synthetisiert. Die Peptide wurden mit Kaninchen-anti-VP1- Serum (1:10) und anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:1000) inkubiert.

3.3.2.2 *Reaktivität der synthetischen Peptide mit Serumpools von HaPV-infizierten Z3-Hamstern*

Für die Pepscan-Analyse der Seren von HaPV-infizierten Hamstern wurden 2 Serumpools aus 19 Seren Papillom-freier Tiere bzw. 10 Seren Papillom-tragender Tiere verwendet. Im Serumpool der Papillom-freien Hamster wurden Antikörper mit zwei unterschiedlichen Epitopspezifitäten beobachtet (Abb. 22): Ein reaktives Peptid mit der Sequenz AKIQLPTLNEDLT ist zwischen den Aminosäuren 101-113 des HaPV-VP1 lokalisiert. Eine zweite reaktive Region wird durch zwei überlappende Peptide repräsentiert (Aminosäuren 165-179 im VP1).

Die Antikörper im Serumpool von Papillom-tragenden Z3 Hamstern erkannten ebenfalls zwei unterschiedliche Sequenzen (Abb.23). Eine N-terminale Region wird durch 4 Peptide repräsentiert und erstreckt sich über die Aminosäuren 79-97 im VP1. Diese Region enthält die Konsensussequenz LTADVK. Bemerkenswert ist, daß der Verlust der Aminosäuren 83 und 84 (SS) in dieser Sequenz zur drastischen Reduzierung der Reaktivität der Region führt. Demnach scheinen diese beiden

Aminosäuren für die Integrität des Epitops von großer Bedeutung zu sein. Die zweite Sequenz, durch zwei Peptide repräsentiert, befand sich zwischen den Aminosäuren 353 und 367 des VP1.

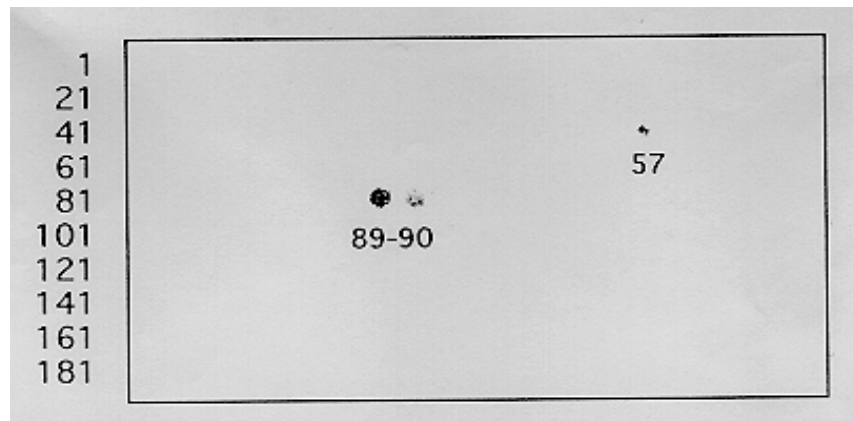


Abb. 22: Reaktivität der synthetischen Peptide mit dem Serumpool von Papillom-freien Z3-Hamstern. Die Peptide wurden mit dem Serumpool (1:10) und anti-Hamster-POD-Konjugat (1:1000) inkubiert.

#57 AKIQLPTLNEDLT

#89 AVGGEPLDLQGLV

#90 GGEPLDLQGLVQN

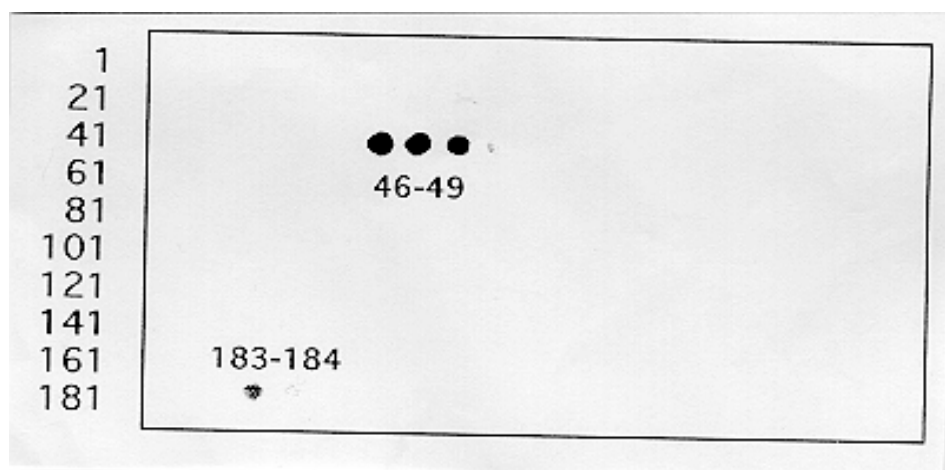


Abb. 23: Reaktivität der synthetischen Peptide mit dem Serumpool von Papillom-tragenden Z3-Hamstern. Die Peptide wurden mit dem Serumpool von Papillom-tragenden Hamstern (1:10) und anti-Hamster-POD-Konjugat (1:1000) inkubiert.

#46 IKVNSSLTADEVK

#47 VNSSLTADEVKAN

#48 SSLTADEVKANQL

#49 LTADEVKANQLPY

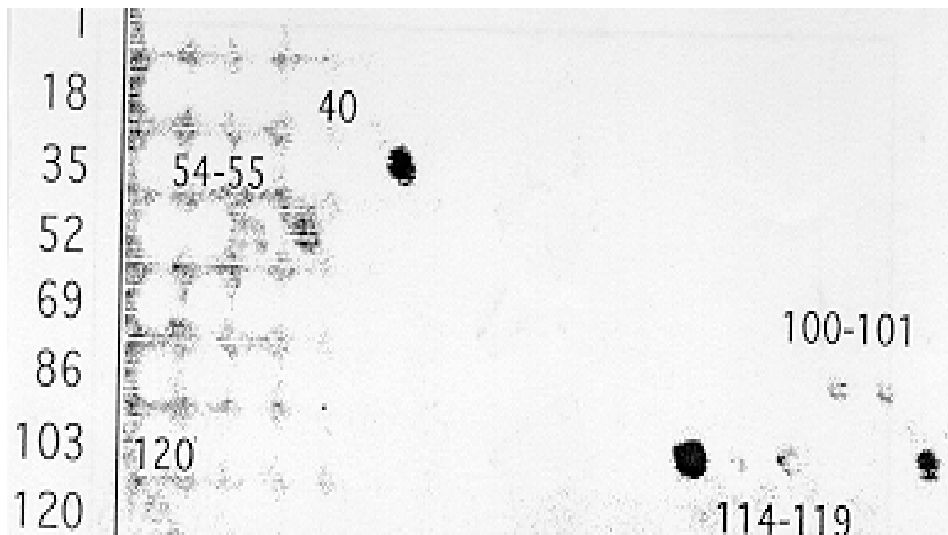
#183 EGTEAVPGDPDVN

#184 TEAVPGDPDVNRF

3.3.2.3. Kartierung kreuzreaktiver Epitope im HaPV-VP1

Die mit Hilfe der rekombinanten Proteine bestimmte kreuzreaktive Region (siehe 3.3.1.3.) sollte mit Hilfe der Pepscan-Methode (13mere Peptide mit einem Raster von 3As) feinkartiert werden. Für diese Untersuchungen wurden Kaninchen-anti-SV40- und -anti-JCV-VP1-Seren verwendet. Die stärksten Signale wurden für das JCV-VP1-spezifische Serum für die Peptide #114 (EGEAAQVEEVRIY), #115 (AAQVEEVRIYEGT), #116 (VEEVRIYEGTEAV) und #119 (TEAVPGDPDVNRF), #120 (VPGDPDVNRFIDK), #121(DPDVNRFIDKYGQ), #122 (VNRfidKYGQqHT) gefunden, die im HaPV-VP1 zwischen den Aminosäuren 340-357 bzw. 355-376 lokalisiert sind.

Im SV40-VP1-spezifischen Serum wurden Antikörper nachgewiesen, die mit den Peptiden #40 (QMWEAVSVKTEVV), #54 (TYHMFavgGEPLD), #55 (MFAVGGEPLDQG), #100 (RGLPRYFNVTLRK), #101 (PRYFNVTLRKRWV) und mit der C-terminalen Region des HaPV-VP1(Peptide #114: EGEAAQVEEVRIY; #115: AAQVEEVRIYEGT; #116: VEEVRIYEGTEAV; #118: YEGTEAVPGDPDV; #119: TEAVPGDPDVNRF; #120: VPGDPDVNRFIDK) reagierten.



a)



b)

Abb. 24: Pepscan-Analyse der SV40-(a) und JCV-VP1-spezifischen Kaninchenserum (b).

4. Diskussion

4.1. Struktur und Proteinzusammensetzung des HaPV-Kapsids

Das Hamster-Polyomavirus ist verantwortlich für die Entwicklung von Epitheliomen bzw. Lymphomen nach der Infektion von Syrischen Hamstern (Graffi et al., 1967, 1968, 1970; Frey et al., 1970; Scherneck und Feunteun 1990). Das HaPV-Genom kodiert für drei frühe und drei späte Genprodukte (Delmas et al., 1985). Während Genprodukte der frühen Region, die für die transformierenden Eigenschaften von HaPV verantwortlich sind (Delmas et al., 1985), intensiv studiert worden sind, sind die Proteine der späten Region, die das Viruskapsid bilden, bisher nicht untersucht worden.

Zur Etablierung des HaPV-Kapsids als neuartigem Träger für fremde Epitope, sollte zunächst das virale Kapsid charakterisiert werden. Zur Charakterisierung der Kapsidproteine des HaPV wurden Virionen aus Epitheliomen von HaPV-infizierten Z3-Hamstern gereinigt. Die Untersuchung der gereinigten Partikel mittels Elektronenmikroskopie zeigte in Übereinstimmung mit früheren Daten (Graffi et al., 1972) sphärische Partikel mit der für Polyomaviren typischen ikosaedrischen Struktur und einem Durchmesser von ca. 45 nm. Dieser Befund stimmt mit Daten zur Struktur und Größe von anderen Polyomaviruskapsiden überein (Shah et al., 1990; Eckhart et al., 1990 und 1994). Aber im Gegensatz zur $T = 7$ -dextro-Symmetrie von murinem Polyomavirus (Finch et al., 1974) und SV40 (Anderer et al., 1967) zeigte das HaPV-Kapsid eine $T=7$ -laevo Symmetrie (Hassen et al., 1998). Die unterschiedliche Kapsidsymmetrie kann darauf zurückgeführt werden, daß die Bindungsstelle der Kapsidproteine unterschiedlich gelagert sind (links oder rechts herum).

Durch Auftrennung von gereinigten Virionen in der SDS-PAGE konnte die Gegenwart von drei strukturellen Proteinen gezeigt werden, deren Molekulargewichte denen der vorhergesagten Proteine VP1, VP2 und VP3 entsprechen. Die Identität

der Kapsidproteine konnte durch Western blot mit monospezifischem anti-HaPV-VP1-Serum bzw. mit Seren HaPV-infizierter Hamster gezeigt werden. Bei anderen Vertretern der Polyomaviren wurden ebenfalls drei Strukturproteine mit ähnlichen Molekulargewichten beschrieben (Cole et al., 1996). Die HaPV-Kapsidproteine zeigen eine starke Aminosäurehomologie zu den Kapsidproteinen des murinen Polyomavirus Py, was auf die evolutionäre Verwandtschaft der beiden Viren hindeutet. Das Hauptkapsidprotein VP1 des HaPV zeigt (im Vergleich zu VP2/VP3) die geringste Divergenz zum VP1 anderer Polyomaviren, was auf die besondere biologische Funktion des Proteins hinweist (Hassen et al., 1998). Das VP1 mit einem Molekulargewicht von ca. 42 kDa stellt den Hauptanteil der HaPV-Kapsidproteine dar. Durch densitometrische Analyse konnte gezeigt werden, daß es ca. 71% der gesamten viralen Strukturproteine ausmacht. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für JCV und murines Polyomavirus beschrieben (Eckhart et al., 1990; Ou et al., 1999; Gillock et al., 1999). Neben diesen Virus-kodierten Strukturproteinen wurden in Viruslysaten auch Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten (ca. 15-16 kDa) beobachtet. Dabei könnte es sich um Viruspartikel-assoziierte zelluläre Histone handeln. Das Vorliegen von zellulären Histonen in Polyomaviruskapsiden wurde auch für LPV und andere Polyomaviren gezeigt (Griffin et al., 1981; Mariott et al., 1985; Pawlita et al., 1996). Es wurde berichtet, daß die zellulären Histone H2A, H2B, H3 und H4 (jedoch nicht H1) mit dem viralen Genom von Polyomaviren assoziiert sind (Griffin et al., 1981).

4.2. Virus-ähnliche Partikel auf der Basis des HaPV-VP1

4.2.1. Die Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln in Insektenzellen

In den 90er Jahren sind in Insektenzellen eine Reihe von VLPs verschiedener Viren erzeugt worden. Das Hauptkapsidprotein L1 unterschiedlicher Papillomvirus-Typen, wie HPV11 (Rose et al., 1993) und HPV 16 (Kimbauer et al., 1992), assemblierte in Insektenzellen zu VLPs, während bei Expression in *E. coli* nur die Bildung von Kapsomeren beobachtet wurde (Li et al., 1997). Auch für Vertreter anderer Virusfamilien, wie Rotaviren (Redmond et al., 1991, 1993; Zeng et al., 1994), Adeno-assoziiertes Virus (Ruffling et al., 1992), Bluetongue Virus (French und Roy, 1990) und Retroviren (Rasmussen et al., 1990), konnte nach heterologer Expression der

Kapsidproteine in Insektenzellen die Bildung von VLPs gezeigt werden. Während die Expression des VP1 von murinem und aviärem Polyomavirus in *E. coli* nur zur Bildung von Kapsomeren führte (Salunke et al., 1986; Rodgers et al., 1994), konnte kürzlich gezeigt werden, daß die VP1-Expression von JCV und HaPV in *E. coli*-Zellen das Assembly von VLPs erlaubt (Ou et al., 1999; Voronkova et al., in Vorbereitung).

Das Baculovirus/Insektenzell-Expressionssystem ist zur Charakterisierung der Polyomavirus- Strukturproteine erfolgreich eingesetzt worden (Montross et al., 1991; Delos et al., 1993; Forstova et al., 1993). Insbesondere wurden mit Hilfe dieses eukaryontischen Systems Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen der Strukturproteine (Delos et al., 1993; Forstova et al., 1993), zur Rolle der posttranslationalen Modifikationen der Strukturproteine (Li et al., 1995), zum Transport und der subzellulären Lokalisation der Kapsidproteine (An et al., 1999b) und zur DNA-Enkapsidierung der Kapsidproteine (Pawlita et al., 1996; Gillock et al., 1997) durchgeführt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß in Insektenzellen gebildete VP1/VP2-VLPs des murinen Polyomavirus in der Lage sind, die Infektion von 3T6-Zellen durch murines Polyomavirus effektiv zu verhindern (An et al., 1999b).

Nachdem das VP1 als Hauptstrukturprotein des HaPV-Kapsids identifiziert und dessen AS-Sequenz verifiziert worden war, sollte in der vorliegenden Dissertation das Protein in Insektenzellen heterolog exprimiert, gereinigt und auf seine Assemblierungsfähigkeit untersucht werden.

Wegen des Vorliegens von 2 in-frame Translations-Initiationskodonen wurden 2 Konstrukte hergestellt, die die Synthese des authentischen VP1 (384 AS) und eines N-terminal verlängerten VP1 (388 AS) erlauben. Die Reinigung der beiden VP1-Derivate aus Insektenzellen mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation ergab erste Hinweise auf das Assembly von VLPs. Der Hauptpeak der VP1-Antigenität wurde in Fraktionen gefunden, die eine Dichte von 1,29-1,30g/cm³ besitzen. Diese Dichte entspricht der, die für leere, d.h. DNA-freie, Polyomaviruspartikel und für VP1-abgeleitete VLPs beschrieben wurde (Chang et al., 1996; Chang et al., 1997; Cole et al., 1996). Dagegen besitzen infektiöse

Polyomavirionen eine Dichte von 1,34g/ml (Shah et al., 1990; Böttger und Scherneck, 1985). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die VP1-enhaltenden Fraktionen auf die Bildung Virus-ähnlicher Partikel untersucht: Sowohl das authentische VP1 als auch sein N-terminal verlängertes Derivat lagerten sich in Insektenzellen spontan zu VLPs zusammen. Diese Partikel besitzen einen Durchmesser von ca. 45 nm. Diese Ergebnisse stimmen nicht nur mit Daten zum in Hefe exprimierten VP1 des HaPV (Sasnauskas et al., 1999) sondern auch mit Daten zu in Insektenzellen exprimierten VP1-Partikeln von murinem Polyomavirus, JCV, LPV und SV40 überein (Montross et al., 1991; Chang et al., 1997; Pawlita et al., 1996; Kosukegawa et al., 1996). Allerdings wurde im Hefe-Expressionssystem eine Größenheterogenität der HaPV-VP1-abgeleiteten VLPs beobachtet (Sasnauskas et al., 1999). Neben den ikosaedrischen Virus-ähnlichen Partikeln, die in Form und Struktur HaPV-Partikeln entsprechen, wurden in den Insektenzellen auch tubuläre Strukturen gefunden. Ähnliche tubuläre Strukturen mit einem Durchmesser von 60-70nm sind auch in einer Metrizamidgradienten-gereinigten LPV-VP1-Präparation gefunden worden (Pawlita et al., 1996).

Offensichtlich kann das HaPV-VP1 wie auch das VP1 anderer Polyomaviren, trotz Fehlen der Kapsidproteine VP2 und VP3 und Fehlen der viralen DNA, in Insektenzellen spontan zu VLPs assemblieren. So führte die Co-Expression des VP1 von murinem Polyomavirus oder SV40 und VP2/VP3 dieser Viren zu keinen signifikanten Unterschieden in Größe und Morphologie der gebildeten VP1-abgeleiteten VLPs (An et al., 1999; Kosukegawa et al., 1996), obwohl durch Co-Expression von VP2 die posttranslationale Modifikation von VP1 beeinflusst wird (An et al., 1999).

4.2.2. Subzelluläre Lokalisation des VP1-Proteins in Insektenzellen

Für eine Nutzung von VLPs für die Gentherapie ist deren Transport zum Zellkern eine wichtige Voraussetzung. Deshalb wurde die subzelluläre Lokalisation des HaPV-VP1 in Insektenzellen durch elektronenmikroskopische Verfahren und subzelluläre Fraktionierung untersucht. Mit Hilfe beider Methoden konnte gezeigt

werden, daß sowohl authentisches als auch N-terminal verlängertes VP1 im Zellkern lokalisiert sind. Diese Ergebnisse belegen, daß im HaPV-VP1 ein intaktes Kernlokalisierungssignal (KLS) vorhanden ist. Im allgemeinen kann ein KLS an einer beliebigen Stelle im Protein liegen. Es besteht aus einem kurzen Peptid, das reich an den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin ist und gewöhnlich auch Prolin enthält (Wychowski et al., 1987). Solche Signale wurden zuerst am large T-Antigen des SV40 nachgewiesen (Kalderon et al., 1984). Der Nachweis des HaPV-VP1 im Zellkern von Insektenzellen zeigt, daß dieses Protein ohne Cotransport-Funktionen anderer viraler Proteine in den Zellkern transportiert wird. Bei anderen Vertretern der Polyomaviridae, z. B. LPV, SV40, JCV, BFDV und murinem Polyomavirus, wurde ein KLS am N-Terminus des VP1 nachgewiesen (Montross et al., 1991; Chang et al., 1992; Pawlita et al., 1996; Ishii et al., 1996; Chang et al., 1997).

Das VP1 des HaPV besitzt zwei Regionen mit einer Abfolge basischer Aminosäuren, die als KLS dienen könnten. Eine befindet sich am N-Terminus, eine andere am C-Terminus (AS 290-314). Beide Regionen sind bei den Polyomaviren stark konserviert (siehe Abb. 24 und 25).

HaPV	M -- A P K R K S G	A S S R C A N P C G	K P C P K P A N V P
PYA2	M -- A P K R K S G	V S - K C E T K C T	K A C P R P A P V P
LPV	M -- A P Q R K --	-- -- R Q D G A C K	K T C P I P A P V P
BFDV	M -- - S Q K G K G	S - - - - -	-- C P R P Q Q V P
JCV	M -- A P T K R K G	E - - - - -	-- R K D P V Q V P
SV40	M K M A P T K R K G	S - - - C P G A A P	K K P K E P V Q V P
BKV(DU)	-- M A P T K R K G	E - - - C P G A A P	K K P K E P V Q V P

Abb. 25: Potentielle Kernlokalisierungssignale am N-Terminus des VP1 von HaPV, murinem Polyomavirus PY(A2), LPV, BFDV, JCV, SV40 und BKV.

Die experimentell bestimmten Kernlokalisierungssignale von murinem Polyomavirus Py (Chang et al., 1992) und SV40 (Wychowski et al., 1986) sind eingerahmt.

HaPV	N S A G W H W	R	G L P	R	Y F N V T L	R K R	W V	K
SV40	S G T Q – Q W	K	G L P	R	Y F K T T L	R K R	S V	K
LPV	S E T Q – V C T A L P	R	Y F N V T L	R K R	I V	K		
Py	N Y V S S L E	K	G F P	R	Y F K T T L	R K R	W V	K
JCV	S G S Q – – W	R	G L S	R	Y F K V Q L	R K R	R V	K
BFDV	R G R Q Y – W	R	G L P	R	Y F S T Q L	R K R	N V	R

Abb. 26. Konservierte basische Aminosäuren in der C-terminalen Region des VP1 von HaPV, SV40, LPV, murinem Polyomavirus Py, JCV und BFDV.

Vergleich der Proteinsequenzen des VP1 von HaPV (AS 290-314) (Delmas et al., 1985; Hassen et al., 1998), SV40 (AS 275-297) (Buchmann et al., 1981), LPV (AS 297-319) (Pawlita et al., 1985), murinem Polyomavirus Py (AS 295-317) (Griffin et al., 1981), JCV (AS 275-296) (Frisque et al., 1984) und BFDV-1 (AS 265-287) (Rott et al., 1988). Konservierte basische Aminosäuren sind im Fettdruck dargestellt.

Überraschenderweise unterschieden sich die beiden HaPV-VP1-Varianten bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen in ihrer subzellulären Lokalisation. Das N-terminal verlängerte VP1 wurde hauptsächlich im Kern beobachtet. Dagegen war das authentische VP1 weniger im Kern lokalisiert. Diese unterschiedliche Kernlokalisierung könnte dadurch erklärt werden, daß zwei der drei zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren im N-terminal verlängerten VP1, insbesondere die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, den Kerntransport verstärken. Es könnte auch sein, daß durch die zusätzlichen Aminosäuren eine Konformationsänderung am N-Terminus stattfindet, wodurch der N-terminale Teil vom VP1 eine bessere Oberflächenexposition erfährt und damit stärkere Wechselwirkungen mit Proteinen, die den Kerntransport fördern, ermöglicht werden. Solche cytoplasmatischen Faktoren, die den Kerntransport eines Proteins fördern, wurden bereits beschrieben (Chang et al., 1992). Auch bei der Expression der beiden Varianten des HaPV-VP1 im Hefesystem wurde das N-terminal verlängerte VP1 des HaPV effizienter zum Kern transportiert als das authentische VP1 (Sasnauskas et al., 1999). Eine cytoplasmatische Assemblierung der Kapsidproteine der Polyomaviren in

Insektenzellen wurde bisher nicht beschrieben (Gillock et al., 1998; An et al., 1999a). Als Ursache dafür wird die im Cytoplasma im Vergleich zum Kern sehr niedrige Ca^{2+} -Konzentration angenommen. Im Gegensatz zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden beide HaPV-VP1-Derivate bei der Zellfraktionierung ausschließlich in den jeweiligen Kernfraktionen nachgewiesen. Möglicherweise sind diese unterschiedlichen Befunde auf die im Vergleich zum Western blot höhere Empfindlichkeit der Elektronenmikroskopie zurückzuführen.

Der überraschende Befund im Insekten- und Hefezellsystem, daß authentisches HaPV-VP1 im Vergleich zum N-terminal verlängerten VP1 mit geringerer Effizienz zum Zellkern transportiert wird, ist möglicherweise auf Unterschiede der Expressionssysteme zur Virus-infizierten Zelle zurückzuführen. So ist zwar das Besetzen eines Kernlokalisierungssignals ein notwendiges aber nicht ausreichendes Kriterium für den Kerntransport (Chang et al., 1992). Die Aktivität des KLS kann durch die Gegenwart einiger aromatischer Aminosäuren oder struktureller Domänen und durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, beeinflusst werden (Jans et al., 1996; Schwemmler et al., 1999). Desweiteren kann die Wechselwirkung von VP1 mit VP2/VP3 den Kerntransport befördern. So wurde ein effektiver Kerntransport des VP1 in Insektenzellen durch Co-Expression mit VP2 erreicht (Delos et al., 1993). Es wurde auch berichtet, daß VP2 und VP3 von SV40, unabhängig von VP1, die Fähigkeit zum Kerntransport besitzen (Clever et al., 1991; Wychowsky et al., 1987; Gharakhanian et al., 1990). Für SV40 und Polyomavirus konnten die Kernlokalisierungssignale der Strukturproteine VP2 und VP3 in einer konservierten Region am Carboxyterminus nachgewiesen werden (Wychowsky et al., 1987; Clever et al., 1991; Gharakhanian et al., 1987; Fattaey et al., 1989). Sowohl SV40- als auch murines Polyomavirus-VP3 besitzen Domänen, die mit VP1 eine Wechselwirkung eingehen (Barouch et al., 1994; Gharakhanian et al., 1988). Chang et al. (1993a) konnten zeigen, daß sich in cos-Zellen exprimiertes VP2 des murinen Polyomavirus im Zellkern befindet. Durch separate Expression von VP3 des Polyomavirus in Insektenzellen konnte gezeigt werden, daß einige VP3-Moleküle zum Zellkern transportiert werden (Delos et al., 1993). Durch Deletion der ersten 11 N-terminalen Aminosäuren des murinen Polyomavirus-VP1 wurde gezeigt, daß sich das entsprechende Protein in den Insektenzellen nur im Cytoplasma befindet. Die

Co-Expression dieses Proteins mit VP2 und VP3 führte dazu, daß das deletierte VP1 im Kern gefunden wurde (Gillock et al., 1998). Frühere Untersuchungen haben auch gezeigt, daß VP2 und VP3 für den Kerntransport des VP1 notwendig sind (Chen et al., 1998; Schmidt et al., 1999; An et al., 1999a). Vermutlich benötigt das authentische VP1 des HaPV für den effektiven Kerntransport die Anwesenheit der kleinen Strukturproteine VP2 und/oder VP3.

4.2.3. Stabilität der Virus-ähnlichen Partikel

Für eine Anwendung von VP1-VLPs in der Gentherapie ist deren Beladung mit der "therapeutischen" Nukleinsäure eine entscheidende Voraussetzung. Deshalb ist die Untersuchung der Dissoziations-Eigenschaften der VLPs von großer Wichtigkeit. In früheren Untersuchungen ist gezeigt worden, daß Polyomaviren durch chelatbildende und reduzierende Substanzen in subvirale Partikeln dissoziiert werden können (Brady et al., 1977).

Versuche zur Dissoziation der HaPV-VP1-abgeleiteten VLPs wurden durch einen Zusatz von EDTA oder EGTA und DTT bei gleicher Inkubationstemperatur durchgeführt. Die VLPs zeigten eine ungewöhnlich hohe Stabilität gegenüber EDTA und DTT: Die Inkubation der VLPs mit 10 mM EDTA /3 mM DTT und mit 50 mM EDTA/20 mM DTT bei 37 °C für 16 Stunden zeigte keine Wirkung auf die Partikel; alle Partikel blieben intakt. Unter gleichen Versuchsbedingungen (37 °C, 16 Stunden) wurde bei Zugabe von 50mM EGTA/20mM EDTA eine partielle Dissoziation beobachtet. Im Vergleich zu EDTA besitzt EGTA eine höhere Affinität für Calcium-Ionen. Diese könnte der Grund für die reduzierte Stabilität der VLPs gegenüber EGTA sein. Während die Inkubation von HaPV-VP1-abgeleiteten VLPs aus Hefezellen mit 10mM EDTA/3mM DTT für 16 Stunden bei 4°C keine signifikante Veränderung der VLPs verursachte, führte die Inkubation der VLPs bei gleicher Konzentration von EDTA/DTT und gleicher Dauer (16 Stunden) jedoch erhöhter Temperatur (37°C) zur Dissoziation von 60-80% der Partikel in Pentamere.

Die Notwendigkeit von Calcium für die Kapsidbildung wurde für verschiedene Viren, einschließlich SV40 und murines Polyomavirus, beschrieben (Haynes et al., 1993; Liddington et al., 1991). Für SV40 und murines Polyomavirus konnte gezeigt werden, daß Calcium-Ionen an das virale Kapsid gebunden sind (Salunke et al., 1986, Liddington et al., 1991). Diese Assoziation des Kapsids mit Calcium-Ionen wird durch das VP1 vermittelt (Haynes et al., 1993). Salunke et al. (1989) konnten zeigen, daß das in *E. coli* synthetisierte VP1 des Polyomavirus auch die Fähigkeit besitzt, Calcium-Ionen zu binden. Die carboxyterminale Region des Polyomavirus-VP1 wurde als Bindungsstelle für Calcium-Ionen identifiziert (Ludlow et al., 1987; Haynes et al., 1993). In dieser Region wurden Calcium-Ionen-bindende Struktur motive, wie Helix-Loop-Helix und EF-hand Motive, nachgewiesen (Haynes et al., 1993). Diese strukturellen Motive kommen auch bei typischen Calcium-bindenden Proteinen, wie Calmodulin, vor (Watterson et al., 1980). Das VP1 des HaPV besitzt ebenfalls eine Domäne, deren Aminosäuresequenz eine starke Homologie zu der von Calcium-bindenden Motiven anderer Proteine besitzt (Abb. 30).

HaPV	D	E	N	G	V	G	P	L	C	K	G	D
PY	D	E	N	G	V	G	P	L	C	K	G	E
SV40	D	E	Q	G	V	G	P	L	C	K	A	D
BFDV	D	E	D	G	S	G	T	I	D	F	E	E
Calmodulin	D	A	D	G	N	G	T	I	D	F	P	E

Abb. 30: Mögliche Calcium-bindende Domäne des VP1 von HaPV

Vergleich der Proteinsequenzen von HaPV (AS 269-280) (Delmas et al., 1985, Hassen et al., 1998), SV40 (AS 247-258) (Buchmann et al., 1981) , murinem Polyomavirus Py (AS 266-277) (Haynes et al., 1993), BFDV (AS 237-248) (Rodgers et al., 1994) und Calmodulin 2 (AS 56-67) (Watterson et al., 1980).

4.2.4. Die Untersuchung der Nukleinsäure-Kontamination von HaPV-VP1-Partikeln

Für eine Anwendung von Polyomavirus-abgeleiteten VLPs zum Gentransfer sollte zunächst eine Kontamination mit zellulärer DNA ausgeschlossen werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit die von authentischem und N-terminal verlängertem VP1-abgeleiteten VLPs auf eine mögliche Nukleinsäurekontamination untersucht.

Überraschenderweise wurde in den vom authentischen VP1 abgeleiteten VLPs eine Nukleinsäure-Kontamination von ca. 5Kb beobachtet; dagegen wurde in VLPs von N-terminal verlängertem VP1 keine Nukleinsäureenkapisierung gefunden. In der Literatur existieren unterschiedliche Befunde zur Nukleinsäure-Kontamination von im Baculovirus-System exprimierten Polyomavirus-Kapsidproteinen. Montross et al. (1991), Kosukegawa et al. (1996) und Forstova et al. (1993) haben gezeigt, daß die Kapsidproteine von verschiedenen Polyomaviren in Insektenzellen zu leeren, d.h. DNA-freien, VLPs assemblieren. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnten andere Autoren zeigen, daß das Kapsidprotein VP1 (ohne VP2 und VP3) in der Lage ist, ca. 5 Kb große DNA zu enkapsidieren (Pawlita et al., 1996; Gillock et al., 1997; An et al., 1999b). Die Autoren konnten zeigen, daß die DNA-Enkapsidierungsfähigkeit der Kapsidproteine in den Insektenzellen von zwei Faktoren, der Multiplizität der Infektion und der Infektionsdauer, abhängig ist. Die Größe der unspezifisch verpackten DNA kommt durch die Fragmentierung der zellulären DNA während der späten Phase der Infektion, die durch eine Baculovirus (AcNPV)-Nuklease-Aktivität vermittelt wird, zustande (Gillock et al., 1997). Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede der Nukleinsäureenkapisierung zwischen den beiden HaPV-VP1-Derivaten wurde wahrscheinlich durch die unterschiedliche Infektionsdauer (authentisches VP1 5 Tage; N-terminal verlängertes VP1 3 Tage) und nicht durch die Infektionsmultiplizität verursacht.

4.3 Epitopmapping zur Ermittlung potentieller Insertionsorte für Fremdsequenzen im VP1 von HaPV

Die Ermittlung potentieller Insertionsorte im VP1-VLP-Trägerprotein kann einerseits durch experimentelle Kartierung von (linearen) Epitopen im HaPV-VP1 und andererseits durch Vorhersage von Oberflächen-exponierten Regionen auf der Basis der experimentell ermittelten Röntgenstruktur von murinem Polyomavirus (Griffith et al., 1992) und SV40 (Liddington et al., 1991) erfolgen.

Die experimentelle Kartierung von (linearen) Epitopen im VP1 wurde mit Hilfe in *E. coli* exprimierter rekombinanter Proteine und synthetischer Peptide durchgeführt. Die Expression der rekombinanten HaPV-VP1-Derivate konnte über die Analyse der *E. coli*-Totallysate in der SDS-PAGE und im Western blot mit monoklonalem anti-His₆-Antikörper nachgewiesen werden. Die rekombinanten Proteine entsprachen den erwarteten Molekulargewichten. Beim kompletten VP1 wurde zusätzlich zum erwarteten DHFR-VP1-Protein (ca. 67 kDa) sowohl im Western blot als auch im gefärbten SDS-PAGE eine kleinere Bande beobachtet. Das Auftreten dieser zusätzlichen Bande mit niedrigerem Molekulargewicht könnte auf einen proteolytischen Abbau des Fusionsproteins zurückzuführen sein. Im Vergleich zu den verkürzten Varianten von VP1 zeigten das komplette VP1 und das C-terminal verkürzte Derivat (aa 1-320) eine deutlich geringere Expression. Ein Grund für die geringere Expression dieser Proteine könnte deren geringere Stabilität sein. Um durch unterschiedliche Proteinkonzentration bedingte Reaktivitätsunterschiede der Fusionsproteine mit Seren zu vermeiden, wurden die Menge der Fusionsproteine in der SDS-PAGE verglichen und durch Einsatz veränderter Totallysatmengen angeglichen.

Für die Epitopkartierung im HaPV-VP1 wurden in dieser Arbeit Kaninchen-anti-VP1-Seren und Seren von HaPV-infizierten Hamstern verwendet. Alle für die Epitopkartierung eingesetzten Seren zeigten eine starke Reaktivität sowohl mit viralem als auch Baculovirus-exprimiertem VP1.

Durch Verwendung des kompletten VP1 und N-terminal deletierter VP1-Derivate konnte eine immundominante Region am C-Terminus von VP1 zwischen den

Aminosäuren 320 und 384 kartiert werden. Alle Seren, sowohl von Papillom-tragenden als auch von Papillom-freien Hamstern, zeigten eine starke Reaktivität mit dem rekombinanten DHFR-VP1-Protein (aa 320-384). Die verminderte Reaktivität der C-terminal deletierten Derivate von VP1 stimmte mit der vorherigen Beobachtung überein, daß das rekombinante Protein aa 29-320 nur von 50 % der HaPV-VP1-positiven Hamsterseren erkannt wurde (Ulrich et al., 1996). Durch Pepscan-Analyse konnte in der C-terminalen Region zwischen den AS 353-367 ein lineares Epitop lokalisiert werden. Allerdings reagierte nur der Serumpool von Papillom-tragenden Tieren mit diesem Peptid. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten Voronkova et al. (in Vorbereitung) zeigen, daß frCP-VP1-Fusionproteine (aa 305-351/ 351-374/ 364-384) mit der Mehrzahl der getesteten Seren von HaPV-infizierten Z3-Hamstern reagieren. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von anti-SV40 und anti-JCV-VP1-positiven Kaninchenseren erhalten. Beide Seren reagierten mit der C-terminalen Region des HaPV-VP1 (aa 320-384). Die Pepscan-Analyse zeigte für beide Seren mehrere C-terminal lokalisierte, reaktive Peptide. Zusammenfassend zeigte das Epitopmapping, daß in der immundominanten Region am C-Terminus des HaPV-VP1 (aa 320-384) sowohl mindestens ein diskontinuierliches und mehrere lineare Epitope lokalisiert sind. In der C-terminalen Region von SV40-VP1 konnte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers ebenfalls ein lineares, Oberflächen-exponiertes Epitop kartiert werden (Babe et al., 1989). Interessanterweise unterscheiden sich JCV-Typen in der C-terminalen Region des VP1 an drei Aminosäure-Positionen (Agostini et al., 1997).

Zusätzliche Epitope wurden in der N-terminalen (aa 1-133) und zentralen Region (aa 133-320) vom HaPV-VP1 kartiert. Jedoch wurden diese Epitope jeweils nur durch einige Hamsterseren erkannt. Beide Regionen wurden auch durch das gegen denaturiertes HaPV-VP1 (aa 29-320) gewonnene Kaninchen-anti-VP1-Serum erkannt. Mit Hilfe synthetischer Peptide konnten die N-terminalen Epitope im Bereich aa 79-97 (Serumpool von Papillom-tragenden Hamstern) und aa 101-113 (Serumpool von Papillom-freien Hamstern) genauer lokalisiert werden. Interessanterweise überlappt die Region (aa 79-97) mit einer hochvariablen Region von BKV-Serotypen (Jin et al., 1993) und einer vorhergesagten Epitopregion in JCV-VP1 (Chang et al., 1996), die sich zwischen einzelnen JCV-Typen und -Subtypen

unterscheidet (Agostini et al., 1997, 1998a,b). Ein weiteres Epitop, in der zentralen Region von VP1, wurde zwischen den Aminosäuren 165 und 179 (Serumpool von Papillom-freien Hamstern) kartiert.

Aufgrund der hohen Aminosäurehomologie zwischen VP1 von HaPV und murinem Polyomavirus wurde die dreidimensionale Struktur von HaPV-VP1 auf der Basis der bekannten Röntgenkristallstruktur des murinen Polyomavirus vorhergesagt. Diese Strukturvorhersage zeigte die Aminosäurebereiche 81-88, 222/223, 244-246, 289-294 und die C-terminale Region des HaPV-VP1 als Oberflächen-exponierte Regionen.

Aus den Untersuchungen konnten insbesondere zwei Regionen im HaPV-VP1 als potentielle Insertionsorte für Fremdsequenzen abgeleitet werden: eine Region zwischen aa 79-97 und die C-terminale Region aa 320-384. Die C-terminale Region (aa 320-384) kann wahrscheinlich nicht als Insertionsort verwendet werden, da diese Region an der Pentameren-Wechselwirkung beteiligt ist (Garcea et al., 1987; Liddington et al., 1991). So führte die Deletion der C-terminalen Region vom VP1 des murinen Polyomavirus zum Verlust der Assembly-Fähigkeit (Garcea et al., 1987). Möglicherweise könnte diese Region jedoch trotzdem für kurze Insertionen verwendet werden. Die erstgenannte Region wurde inzwischen erfolgreich für die Insertion einer Pentapeptidfremdsequenz verwendet (Gedvilaite et al., eingereicht).

4.4. Ausblick

In weiteren Untersuchungen soll geklärt werden, ob die in dieser Arbeit ermittelten Insertionsorte in der Lage sind, die Insertion und Oberflächenexposition von Fremdproteinsequenzen unterschiedlicher Länge zu tolerieren. Für die Anwendung der VP1-abgeleiteten VLPs in der Gentherapie soll ein Dis-Assembly/Re-Assembly-Verfahren entwickelt werden, das zur Eliminierung unerwünschter Nukleinsäurekontaminationen führt. Weiterführende Untersuchungen sollen zeigen, inwieweit VLPs aus VP1 und VP2/VP3 einen besseren Kerntransport und eine Co-Expression von Fremdsequenzen ermöglichen.

5. Literatur

Adams, S.E., Burns, N.R., Layton, G.T. and Kingsman, A.J. (1994): Hybrid Ty virus-like particles. *Int. Rev. Immunol.* 11, 133-141.

Agostini, H.T., Ryschkewitsch, C.F., Brubaker, G.R., Shao, J. and Stoner, G. (1997): Five complete genomes of JC virus type 3 from Africans and African Americans. *Arch Virol.* 142, 637-655.

Agostini, H.T., Ryschkewitsch, C.F., and Stoner, G. (1998a): JC virus type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes. *J. Gen. Virol.* 79, 801-805.

Agostini, H.T., Hara, Y.S., Baumhefner, R.W., Singer, E.J., Ryschkewitsch, C.F. and Stoner, G. (1998b): JC virus type 2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes. *J. Gen. Virol.* 79, 1143-1151.

Agterberg, M., Adriaanse, H., Baltering, S., Van Maanen, K. and Tommassen, J. (1990): Protection of guinea-pigs against foot and mouth disease virus by immunization with a PhoE-FMDV hybrid protein. *Vaccine* 8, 438-440.

Alwinne, J.C. (1982): Evidence for simian virus 40 late transcriptional control: mixed infections of wild-type simian virus 40 and a late leader deletion mutant exhibit trans effects on late viral RNA synthesis. *J. Virol.* 42, 798-803.

An, K., Smiley, S.A., Gillock, E.T., Reeves, W.M. and Consigli, R.A., (1999a): Avian polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the minor capsid proteins and is transported into the cell nucleus but does not assemble into capsid-like particles when expressed in the baculovirus system. *Virus Res.* 64, 173-185.

An, K., Gillock, E.T., Sweat, J.A., Reeves, W.M., and Consigli, L.A. (1999b): Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural protein: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J. Gen. Virol.* 80, 1009-16.

Anderer, F.A., Schlumberger, H.D., Koch, M.A., Frank, H. and Eggers, H.J. (1967): Structure of simian virus 40: symmetry and components of the virus particle. *Virology* 32, 511-523

Anders, D.G. and Consigli, R.A. (1983): Chemical cleavage of polyomavirus major capsid structural protein VP1: identification of cleavage products and evidence that the receptor moiety resides in the carboxy-terminal region. *J. Virol.* 48, 197-205.

Anderson, W. F. (1992): Human Gene Therapy. *Science* 256, 808-813.

Babe, L.M., Brew, K., Matsuura, S. E. and Scott, W. A. (1989): Epitopes on the major protein of Simian Virus 40. *J. Biol. Chem* 264, 2665-2671.

Berger, H. and Wintersberger, E. (1986): Polyomavirus small T antigen enhances replication of viral genomes in 3T6 mouse fibroblasts. *J. Virol.* 60, 768-770.

Ball, J.M., Hardy, M.E., Robert, L.A., Conner, M.E. and Estes, M.K. (1998): Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J. Virol.* 1345-1353.

Barbanti-Brodano, G., Martini, F., De Mattei, M., Lazzarin, L., Corallini, A. and Tognon, M. (1998): BK and JC human polyomaviruses and a simian virus 40: natural history of infection in humans, experimental oncogenicity and association with humans tumor. *Adv. Virus Res.* 50, 69-99.

Barouch, D.H. and Harrison, S.C. (1994): Interaction among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.* 68, 3982-3989.

Böttger, M., and Scherneck, S.(1985). Heterogeneity, molecular weight and stability of an oncogenic papovavirus of the syrian hamster. *Arch. Geschwulsforsch.* 55. 225-233.

Böttger, M., Bierwolf, D., Wunderlich, V. and Graffi, A. (1971): The molecular weight of the DNA of an oncogenic papovavirus of the syrian Hamster. *Biochem.Biophys.Acta.* 232, 21-31.

- Bolen, J.B., Anders, D.G., Trempy, J. and Consigli, R.A. (1981): Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological function of the multiple VP1 species. *J. Virol.* 37, 80-91.
- Boulter, N.R., Glass, E.J., Knight, P.A., Bell-Sakyi, L., Brown, C.G.D. and Hall, R. (1995): Theileria annulata sporozoite antigen fused to hepatitis B core antigen used in a vaccination trial. *Vaccine* 13, 1152-1160.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 246-264.
- Brady, J.N., Winston, V. D. and Consigli, R.A. (1977): Characterization of a DNA-protein complex and capsomere subunits derived from polyoma virus by treatment with ethyleneglycol-bis-N,N'-tetraacetic acid and dithiothreitol. *J. Virol.* 27, 193-204.
- Braun, H., Boller, K., Lower, J., Bertling, WM. and Zimmer, A. (1999): Oligonucleotide and Plasmid DNA packaging in to polyoma VP1 virus-like particles expressed in Escherichia coli. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 31-43.
- Breitbrud, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N.L., Nonnenmacher, B., Desmarquet, T.D., Orth, G., Schiller, J.T. and Lowy, D.R. (1995): Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* 13, 1509-1514.
- Brennan, F.R., Bellaby, T., Helliwell, S.M., Jones, T.D., Kamstrue, S., Dalsgaard, K., Flock, J.I. and Hamilton, W.D.O. (1999): Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *J. Virol.* 73, 930-938.
- Britt, W., Fay, J., Seals, J., Kensil, C. (1995): Formulataion of an immunogenic human cytomegalovirus vaccine: responses in mice. *J. Infect. Dis.* 171, 18-25.
- Brochier, B., Boulanger, D., Costy, F. and Pastoret, P.P. (1994): Toward rabies elimination in Belgium by fox vaccination using a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus. *Vaccine* 12, 1368-1371.

- Broekhuijsen, M.P., van Rijn, J.M.M., Blom, A.J.M., Pouwels, P.H., Enger-Valk, B.E., Brown, F. and Francis, M.J. (1987): Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot and mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. *J. Gen. Virol.* 68, 3137-3143.
- Buchmann, A.R., Burnett, L., and Berg, P. (1981): The SV40 nucleotide sequence. In: *DNA Tumor Viruses* (Tooze, J., ed) Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 799-841.
- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S. and Consigli, R.A. (**1994**): Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J. Virol.* 68, 7609-7613.
- Chambers, M., Dougan, G., Newman, J., Brown, F., Crowther, J., Mould, A.P., Humphries, M.J., Francis, M.J., Clarke, B., Brown, A.L. and Rowlands, D. (1996): Chimeric hepatitis B virus core particles as probes for studying peptide-integrin interactions. *J. Virol.* 70, 4045-4052.
- Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. (1978): Phenotypic expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase. *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156.
- Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N. and Consigli, R.A. (1992): The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189, 821-827.
- Chang, D., Cai, X. and Consigli, R.A. (**1993a**): Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J. Virol.* 67, 6327-6331.
- Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N. and Consigli, R.A. (**1993b**): Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191, 978-983.
- Chang, D., Liou, Z.M., Ou, W.C., Wang, K.Z., Wang, M., Fung, C.Y. and Tsai, R.T. (1996): Production of the antigens and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J. Virol. Methods* 59, 177-187.

- Chang, D., Fung, C.Y., Ou, W.C., Chao, P.C., Li, S.Y., Wang, M., Huang, Y.L., Tzeng, T.Y. and Tsai, R.T. (1997): Self-assembly of the JC virus major capsid protein VP1 expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 78, 1435-1439.
- Chen, S.L., Tsao, Y.P., Chen, Y.L., Huang, S.J., Chang, J.L. and Wu, S.F. (1998): The induction of apoptosis by SV40 T antigen correlates with c-jun overexpression. *Virology* 244, 521-529.
- Chen, X.S., Stehle, T. and Harrison, S.C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implication for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17, 3233-3240.
- Christensen, N.D., Hopil, R., DiAngelo, S.L., Cladel, N.M., Patrick, S.D., Welsh, P.A., Budgeon, L.R., Reed, C.A., Kreider J.W. (1994): Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* 78, 2271-2276.
- Clarke, B.E., Newton, S.E., Carroll, A.R., Francis, M.J., Appleyard, G., Syred, A., Highfield, P.E, Rowlands, D.J. and Brown, F. (1987): Improved immunogenicity of a peptid epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature* 330, 381-384.
- Clarke, B.E., Brown, A.L., Grace, K.G., Hastings, G.Z., Brown, F.L , Rowlands, D.J. and Francis, M.J. (1990): Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B core particles produced in bacteria. *J. Gen. Virol.* 71, 1109-1117
- Clever, J. and Kasamatsu, H. (1991): Simian virus 40 VP2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology* 181, 78-90.
- Clever, J., Dean, D.A. and Kasamatsu, H. (1993): Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins VP2 and VP3. *J. Biol. Chem.* 268, 20877-20883.

- Colby, W.W. and Shenk, T. (1982): Fragments of the SV40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5189-5193.
- Cole, C.N. (1996): Polyomavirinae: The viruses and their replication. In: *Virology* 3rd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.) Raven Press, New York, pp. 1997-2025.
- Courtneidge, S. A. (1985): Activation of the pp60c-src kinase by middle T antigen binding or dephosphorylation. *EMBO J.* 4, 1471-1477.
- Courtneidge, S.A. and Smith, A.E. (1983): Polyomavirus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* 303, 435-439.
- Courtneidge, S.A., Goutebroze, L., Cartwright, A., Heber, A., Scherneck, S. and Feunteun, J. (1991): Identification and characterization of the hamster polyoma middle T antigen. *J. Virol.* 65, 3301-3308.
- Crown, J. and Henco, K. (1992): The high level expression and protein purification system. In: *The QIA expressionist*, Diagen GmbH, pp.23-26.
- Crystal, G. R. (1995): Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270, 404-410.
- Dean, D.A., Li, P.P., Lee, L.M and Kasamatsu, H. (1995): Essential role of the VP2 and VP3 DNA-binding domain in Simian Virus 40 morphogenesis. *J. Virol.* 69, 1115-1121.
- Decaprio, J.A., Ludlow, J.W. and Figge, J. (1988): SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-283.
- De la Roche Saint Andre, C. and Feunteun, J (1993): Distinct segments of the hamster polyomavirus regulatory region have differential effects on DNA replication. *J. Gen. Virol.* 74, 125-128.

- De La Roche Saint Andre, C., Harper, F. and Feunteun, J. (1990): Analysis of the hamster polyomavirus infection in vitro: Host-restricted productive cycle. *Virology* 177, 532-540.
- De la Roche Saint Andre, C., Mazur, S. and Freunteun, J. (1993): Viral Genomes maintained extrachromosomally in hamster polyomavirus-induced lymphomas display a cell-specific replication in vitro. *J. Virol.* 7172-7180.
- Delmas, V., Bastien, C., Scherneck, S. and Feunteun, J. (1985): A new member of the polyoma virus family: the hamster papovavirus: complete nucleotide sequence and transformation properties. *EMBO J.* 4, 1279-1286.
- Delos, S.E., Montross, L., Moreland, R. B. and Garcea, R.L. (1993): Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology* 194, 393-398.
- Delos, S.E., Timothy, P.C., Leavitt, D.A., Greisman, H. and Garcea, R.L. (1995): Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: in vitro interaction with recombinant VP1 capsomeres. *J. Virol.* 69, 7734-7742.
- Diamandopoulos, G.T. (1972): Leukemia, lymphoma and osteosarcoma induced in the syrian golden hamster by simian virus 40. *Science* 176, 173-175.
- Dyson, N., Bernards, R., Friend, S.H., Gooding, L.R., Hassell, J.A., Major, E.O., Pipas, J.M., Vandyke, T., and Harlow, E.D. (1990): Large T antigen of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J. Virol.* 64, 1353-1356.
- Eckhart, W. (1990): Polyomavirinae and Their Replication. In: *Virology* 2nd edition (B.N. Fields, D.M. Knipe et al., eds.). Raven press, New York, pp. 1593-1603.
- Ellis, R.W. (1996): The new generation of recombinant viral subunit vaccines. *Current opinion in Biotechnology* 7, 646-652.

- Engelhardt, F.J., Y.E., X., Doranz, B. and Wilson, M.J. (1994): Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91, 6196-6200.
- Fattaey, A. and Consigli, R.A. (1989): Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. *J. Virol.* 63, 3168-3175.
- Finch, J.T. (1974): The surface structure of polyoma virus. *J. Gen. Virol.* 24, 359-364.
- Forstova, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S. and Griffin, B.E. (1993): Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 67, 1405-1413.
- Forstova, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palkova, Z., Strauss, M. and Griffin, B.E. (1995): Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Human Gene Therapy* 6, 297-306.
- French, T.J. and Roy, P.C. (1990): Synthesis of bluetongue virus (BTV) core like particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J. Virol.* 64, 1530-1536.
- Frey, F., Schramm, T., Bender, E. und Rudolph, M. (1970): Untersuchungen zur Histogenese Hamster-Papovavirus-induzierter Leukosen. *Arch. Geschwulstforsch.* 36, 10-18.
- Frisque, R.J., Bream, G.L. and Cannella, M.T. (1984): Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* 51, 458-469.

- Gao, X.M., Tite, J.P, Lipscombe, M., Rowland-Jones, S., Ferguson, D.J. and McMichael, A.J. (1992): Recombinant Salmonella typhimurium strains that invade nonphagocytic cells are resistant to recognition by antigen-specific T-lymphocytes. *Infect. Immun.* 60, 3780-3789.
- Garcea, R.L., Ballmer-Hofer, K. and Benjamin, T.L. (1985): Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *J. Virol.* 54, 311-316.
- Garcea, R.L., Salunke, D.M. and Caspar, D.L. (1987): Site-directed mutation affecting polyomavirus self-assembly in vitro. *Nature* 329, 86-87.
- Geysen, H.M., Rodda, S.J. and Mason, T.J. (1986): A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 23, 709-715.
- Gharakhanian, E. and Kasamatsu, H. (1990): Two independent signals, a nuclear localization signal and a VP1-interactive signal, reside within the carboxy-35 amino acids of SV40 VP3. *Virology* 178, 62-71.
- Gharakhanian, E., Takahashi, J., Clever, J. and Kasamatsu, H. (1988): In vitro assay for protein-protein interaction: carboxyl-terminal 40 residues of simian virus 40 structural protein VP3 contain a determinant for interaction with VP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6607-6611.
- Gharakhanian, E., Takahashi, J. and Kasamatsu, H. (1987): The carboxyl 35 amino acids of SV40 VP3 are essential for its nuclear accumulation. *Virology* 157, 440-448.
- Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D, Cai, S.A., Smiley, S.A., An, K. and Consigli, R.A., (1997): Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* 71, 2857-2865.
- Gillock, E.T., An, K., and Consigli, R.A., (1998): Truncation of the nuclear localization signal of polyomavirus VP1 results in a loss of DNA packaging when expressed in the baculovirus system. *Virus Res.* 58, 149-160.

- Goldmann, C., Petry, H., Frey, S., Ast, O., Ebitsch, S., Jentsch, K.D., Kaup, F.J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T. and Lücke, W., (1999): Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: Formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J. Virol.* 73, 4465-4469.
- Goutebroze, L. and Feunteun, J. (1992): Transformation by hamster polyomavirus: Identification and functional analysis of the early genes. *J. Virol.* 66, 2496-2504.
- Graffi, A., Bender, E., Schramm, T., Kuhn, W. and Schneiders, F. (1969): Induction of transmissible lymphomas in Syrian hamsters by application of DNA from viral hamster papovavirus-induced tumors and by cell-free filtrates from human tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 1172-1175.
- Graffi, A., Schramm, T., Bender, E., Bierwolf, D. and Graffi, I. (1967): Über einen neuen virushaltigen Hauttumor beim Goldhamster. *Arch. Geschwulstforsch.* 30, 277-283.
- Graffi, A., Schramm, T., Bender, E., Graffi, I., Horn, K.H. and Bierwolf, D. (1968): Cell free transmissible leukoses in Syrian hamster, probably of viral aetiology. *Brit. J. Cancer* 22, 577-581.
- Graffi, A., Grummel, H. and Möbius, W. (1972): Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Papova (Papillom)-Virus des Goldhamsters. *Arch. Geschwulstforsch.* 40, 191-236.
- Grass, D.S. and Manley, J.L. (1987): Selective translation initiation on bicistronic simian virus 40 late mRNA. *J. Virol.* 61, 2331-2335.
- Griffin, B.E. (1981): Structure and genomic organization of SV40 and polyomavirus. In: *DNA tumor viruses* (J. Tooze, ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 61-123.
- Griffith, J.P., Griffith, D.L., Rayment, I., Murakami, W.T. and Caspar, D.L. (1992): Inside polyomavirus at 25 Å resolution. *Nature* 355, 652-654.

- Griffiths, J.C., Harris, S.J., Layton, G.T., Berrie, E.L., French, T.J., Burns, N.R., Adams, S.E. and Kingsman, A.J. (1993): Hybrid human immunodeficiency virus Gag particles as an antigen carrier system: Induction of cytotoxic T-cell and humoral responses by a Gag V3 fusion. *J. Virol.* 67, 3191-3198.
- Günther, J. und Beck-Sickinger, A.G. (1992): Methoden der multiplen Peptidsynthese und ihre Anwendungen. *Angewandte Chemie* 104, 375-391.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N. and Galloway, D.A. (1993): Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 67, 315-322.
- Hassen, S., Özel, M., Jandrig, B., Voronkova, T., Jia, W., Zocher, R., Arnold, W., Scherneck, S., Krüger, D.H. and Ulrich, R. (1998): Capsid protein-encoding genes of hamster polyomavirus and properties of the viral capsid. *Virus Genes* 18, 39-47.
- Haun, G., Kepper, O.T., Bock, C.T., Hermann, M., Zentgraf, H. and Pawlita, M. (1993): The cell surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol.* 67, 7482-7492.
- Hay, N., Skolnik-David, H. and Aloni, Y. (1982): Attenuation in the control of SV40 gene expression. *Cell* 29, 183-193.
- Haynes II, J.I. and Consigli, R.A. (1993): Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *J. Virol.* 67, 2486-2495.
- Hermann, M., Oppenländer, M. and Pawlita, M. (1995): Fast and high affinity binding of B-lymphotropic papovavirus to human B-lymphoma cell lines. *J. Virol.* 69, 6797-6804.
- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. and Strauss, M., (1995): Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10099-10103.

Hu, S.L., Abrams, K., Barber, G.N., Moran, P., Zarling, J.M., Langlois, A.J., Kuller, L., Morton, W.R., and Benveniste, R.E. (1992): Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science* 225, 456-459.

Ishii, N., Minami, N., Chen, E.Y., Medina, A. L., Chico, M. M. and Kasamatsu, H. (1996): Analysis of a nuclear localization signal of Simian Virus 40 major capsid protein VP1. *J. Virol.* 70, 1317-1322.

James, M.P. (1994): Polyomaviruses - murine. *Molecular Biology. In: Encyclopedia of Virology* Vol. 3 (G.W. Roberts and G. Allan et al., eds) Academic Press London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto. pp.1134-1139.

Jemmerson, K. and Paterson, Y. (1986): Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen-antibody complexes. *Science* 232, 1001-1004.

Jin, L., Gibson, P.E., Knowles, W.A. and Clewley, J.P (1993): BK virus antigenic variants: Sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J. Med. Virol* 39, 50-56.

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E. (1984): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.

Kasamatsu, H. and Nehorayan, A. (1979): VP1 affects intracellular localization of VP3 polypeptide during simian virus 40 infection. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2808-2812.

Keppler, O.T., Hermann, M., Oppenländer, M., Meschede, W. and Pawlita, M. (1994): Regulation of susceptibility and cell surface receptor for the B-lymphotropic papovavirus by N glycosylation. *J. Virol.* 68, 6933-6939.

Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Dürst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1993): Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* 67, 6929-6936.

- Kishchenko, G., Batliwala, H. and Makowski, L. (1994): Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.* 241, 208-213.
- Klein, D. and Günzburg, H.W. (1997): Comparison of viral vectors: Implications for gene therapy. *Bioforum International* 2, 102-109.
- Kosukegawa, A., Arisaka, F., Takayama, M., Yajima, H., Kaidow, A. and Handa, H. (1996): Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid protein in insect cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 37-45.
- Kornbluth, S., Sudol, M. and Hanafusa, H. (1987): Association of the polyomavirus middle T antigen with c-yes protein. *Nature* 325, 171-173.
- Krauzewicz, N., Streuli, B.E., Stuart-Smith, N., Jones, M.D., Wallace, S. and Griffin, B.E. (1990): Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J. Virol.* 64, 4414-4420.
- Laemmli, E.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Layton, G.T., Harris, S.J., Gearing, A.J.H., Hill-Perkins, M., Cole, J.S., Griffiths, J.C., Burns, N.S., Kingsman, A.J. and Adams, S.E. (1993): Induction of HIV specific cytotoxic T-lymphocytes in vivo with hybrid HIV-1 V3 Ty-virus-like particles. *J. Immunol.* 151, 1097-1107.
- Leavitt, A.D., Roberts, T.M. and Garcea, R.L. (1985): Polyoma virus major capsid protein VP1: purification after high level expression in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 260, 12803-12809.
- Lenstra, J.A., Kusters, J.G. and Van der Zeijst, B.A.M. (1990): Mapping of viral epitopes with prokaryotic expression products. *Arch. Virol.* 110, 1-24.

- Li, M. and Garcea, R.L., (1994): Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: Relationship to the activity of middle T antigen. J. Virol. 68, 320-327.
- Li, M., Delos, S.E., Montross, L. and Garcea, R.L. (1995): Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5992-5996.
- Li, M., Cripe, T.P., Ester, P.A., Lyon, M.K., Rose, R.C. and Garcea, R.L. (1997). Expression of the human papillomavirus type-11 L1 capsid protein in Escherichia coli: Characterization of protein domains involved in DNA-binding and capsid assembly. J. Virol. 71, 2988-2995.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L. and Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8 Å resolution. Nature 354, 278-284.
- Lin, W., Hata, T. and Kasamatsu, H. (1984): Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection. J. Virol. 50, 363-371.
- Lin, W., Shurgot, J. and Kasamatsu, H. (1986): The synthesis and transport of SV40 structural proteins. Virology 154, 108-120.
- Ludlow, J. W. and Consigli, R.A. (1989): Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus. J. Virol. 63, 2881-2884.
- Ludlow, J. W. and Consigli, R.A. **(1987)**: Localization of calcium on the polyomavirus VP1 capsid protein. J. Virol. 61, 2934-2937.
- Maeji, N.J., Bray, A.M., Valerio, R.M and Wang, W. (1995): Large scale multipin peptide synthesis. Peptide Res. 8, 33-38.

- Maria, R.M., Nikolaio, A. and Heidi, E. H. (1996): Proteolytic fragmentation for epitope mapping: Epitope mapping protocols: In: *Methods in Molecular Biology Vol 66* (Morris, G.E., ed.), Humana Press Inc., Totowo, New Jersey, pp. 109-121.
- Marriott, S.J. and Consigli, R.A. (1985): Production und characterization of monoclonal antibodies to polyomavirus major capsid protein VP1. *J. Virol.* 56, 365-372.
- Masters, J.N. and Attardi, G. (1983): The nucleotide sequence of the cDNA coding for the human dihydrofolic acid reductase. *Gene* 21, 59-63.
- Mastico, R.A., Talbot, S.J. and Stockley, P.G. (1993): Multiple presentation of foreign peptides on the surface of an RNA-free spherical bacteriophage capsid. *J. Gen. Virol.* 74, 541-548.
- Mercer, W.E., Nelson, D., Deleo, A.B., Old, L.J. and Baserga, R. (1982): Inhibition of SV40-induced cellular DNA synthesis by microinjection of monoclonal antibodies. *Virology* 127, 149-158.
- Michel, M.L., Mancini, M., Schlienger, K. and Tiollais, P. (1993): Recombinant hepatitis B surface antigen as a carrier of human immunodeficiency virus epitopes. *Res. Virol.* 144, 263-267.
- Miller, A.D. (1992): Human gene therapy comes of age. *Nature* 57, 455-460.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L.D. und Garcea, R.L. (1991): Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 4991-4998.
- Moreland, R.B., Montross, L. and Garcea, R.L. (1991): Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virol.* 65, 1168-1176.
- Morgan, A.R. and Anderson, F.W. (1993): Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 191-217.

Morris, G.E. (1996): Epitope mapping by chemical fragmentation: Epitope mapping protocols. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 66 (Morris, G.E., ed.), Humana Press Inc., Totowa New Jersey, pp. 121-127.

Mulligan, C.R., (1993): The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.

Ng, S.C., Mertz, J.E., Sanden-Will, S. and Bina, M. (1985). Simian virus 40 maturation in cells harboring mutants deleted in the agnogene. *J. Biol. Chem.* 260, 1127-1132.

Nomura, S., Khoury, G. and Jay, G. (1983): Subcellular localization of the simian virus 40 agnoprotein. *J. Virol.* 45, 428-433.

O'Neal, C.M., Crawford, S.E., Estes, M.K. and Conner, M.E. (1997): Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J. Virol.* 71, 179-185.

Ou, W.C., Wang, M., Fung, C.Y., Tsai, R.T., Chao, P.C., Hseu, T.H. and Chang, D. (1999): The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *E. coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J. Gen. Virol.* 80, 39-46.

Pallas, D.C., Sharhrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L. and Robert, T.M. (1990): Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60, 160-176.

Pawlita, M., Clad, A. and zur Hausen, H. (1985): Complete DNA sequence of lymphotropic papovavirus: prototype of a new species of the polyomavirus genus. *Virology* 143, 196-211.

Pawlita, M., Müller, M., Oppenländer, M., Zentgraf, H. and Herrmann, M., (1996): DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol.* 70, 7517-7526.

- Perales, C. J., Ferkol, T., Beegen, H., Ratnoff, D.O. and Hanson, W. R. (1994): Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of gene introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4086-4090.
- Perkas, C.M. and Paoletti, E., (1996): Recombinant virus as vaccination carrier of heterologous antigens: In: *Concepts in vaccine development* (S.H.E. Kaufmann ed.), de Gruyter, Berlin, NewYork, pp. 379-407.
- Post, L.E., Norrild, B., Simpson, T. and Roizmann, B. (1982): Chicken ovalbumin gene fused to a herpes simplex virus promoter and linked to a thymidine kinase gene is regulated like a viral gene. *Mol. Cell. Biol.* 2, 233-240.
- Prokoph, H., Arnold, W., Schwartz, A. and Scherneck, S., (1996): In vivo replication of hamster polyomavirus DNA displays lymphotropism in hamsters susceptible to lymphoma induction. *J. Gen Virol.* 77, 2166-2172.
- Prokoph, H., Jandrig, B., Arnold, W. and Scherneck, S. (1997): Generation of lymphoma-type variant hamster polyomavirus genomes in hamsters susceptible to lymphoma induction. *Arch. Virol.* 142, 53-63.
- Rasmussen, L., Battles, J.K., Ennis, W.H., Nagashima and Gonda, M.A. (1990): Characterization of virus-like particles produced by a recombinant baculovirus containing the gag gene of the bovine immunodeficiency like virus. *Virology* 178, 435-451.
- Rawling, E.G., Martin, N.L. and Hancock, R.E.W. (1995): Epitope mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane porin protein. *Infect. Immunol.* 63, 38-42.
- Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L.D. and Murakami, W.T. (1982): Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295, 110-115.

- Redmond, M.J., Ohmann, H.B., Hughes, H.P., Sabara, M., Frenchick, P.J., Poku, S.K., Ijaz, M.K., Parker, M.D., Laarveld, B. and Babiuk, L.A. (1991): Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins. *Mol. Immunol.* 28, 269-278.
- Reider, E., Baxt, B., Lubroth, J. and Mason, P.W. (1994): Vaccines prepared from chimeras of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies and protective immunity to multiple serotypes of FMDV. *J. Virol.* 68, 7092-7098.
- Resnick, J. and Shenk, T. (1986): Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell-to-cell spread of virus. *J. Virol.* 60, 1098-1106.
- Rodgers, D.E.R., Chang, D., Cai, X. and Consigli, R. (1994): Purification of recombinant Budgerigar Fledgling Disease Virus VP1 capsid protein and its ability for in vitro capsid assembly. *J. Virol.* 68, 3386-3390.
- Roos, S., Fuchs, K. and Roggendorf, M. (1989): Protection of woodchucks from infection with woodchuck hepatitis virus by immunization with recombinant core protein. *J. Gen. Virol.* 70, 2087-2095.
- Rose, R.C., Bonnez, W., Reichman, R.C. and Garcea, R.L. (1993): Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and vitro assembly of viruslike particles. *J. Virol.* 67, 1936-1944.
- Rost, B., Sander, C and Schneider, R (1993): Progress in protein structure prediction? *Trends Biochem. Sci.* 18, 120-123.
- Rovinski, B., Rodrigues, L., Cao, S., Yao, F.L., McGuinness, U., Sia, C., Cates, G., Zolla-Pazner, S., Karwowska, S. and Matthews, T.J., (1995): Induction of HIV type 1 neutralizing antibodies by immunization with genetically-engineered HIV type 1-like particles containing unprocessed gp160 glycoproteins. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1187-1195.
- Ruffing, M., Zentgraf, H. and Kleinschmidt, J.A. (1992): Assembly of virus like particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J. Virol.* 66, 6922-6930.

Salunke, D.M., Caspar, D.L.D. and Garcea, R.L (1986): Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895-904.

Salunke, D.M., Caspar, D.L.D. and Garcea, R.L. (1989): Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J.* 56, 887-900.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, J., (1989): *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sandalon, Z. and Oppenheim, A. (1997): Self-assembly and protein-protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology* 237, 414-421.

Sandalon, Z., Dalyot-Herman, N., Oppenheim, A.B. and Oppenheim, A. (1997): In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 8, 843-849.

Sasnauskas, K., Buzaitė, O., Vogel, F., Jandrig, B., Razanskas, R., Staniulis, J., Scherneck, S., Krüger, D.H. and Ulrich, R., (1999): Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.* 380, 381-386.

Scherneck, S., Delmas, V., Vogel, F. and Feunteun, J. (1987): Induction of lymphomas by the hamster polyomavirus correlates with massive replication of nonrandomly deleted extrachromosomal viral genome. *J. Virol.* 61, 3992-3998.

Scherneck, S. and Feunteun, J. (1990): The hamster polyomavirus: A brief review of recent knowledge. *Arch. Geschwulstforsch.* 60, 272-278.

Scherneck, S., Vogel, F., Nyuygen, H.L. and Feunteun, J. (1984): Sequence homology between polyomavirus, simian virus, and a papilloma-producing virus from a Syrian hamster: evidence for highly conserved sequences. *Virology* 137, 41-48.

- Schmidt, U., Kenklies, J., Rudolph, R., and Böhm, G. (1999): Site-specific fluorescence labelling of recombinant polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.* 380, 397-401.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W. (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts prepared from a small number of cells. *Nucl. Acids Res.* 15, 6419-6436.
- Schirmbeck, R., Melber, K., Kuhröber, A., Janowicz, Z. and Reimann, J. (1994): Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J. Immunol.* 152, 1110-1119.
- Schirmbeck, R., Böhm, W. and Reimann, J. (1996): Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. *Intervirology* 39, 111-119.
- Schneider, R. and Sander, C. (1996): The HSSP database of protein structure-sequence alignments. *Nucl. Acids Res.* 24, 201-205.
- Schofield, J.P. and Caskey, C.T. (1995): Non-viral approaches to gene therapy. *British Medical Bulletin* 51, 56-71.
- Schneider-Mergener, J. and Engert, R.V. (1998): *Der Sprache der Biomoleküle auf der Spur.* Humboldt-Spektrum 4, 4-11.
- Schödel, F., Wirtz, R., Peterson, D., Hughes, J., Warren, R., Sadoff, J. and Milich, D (1994): Immunity to malaria elicited by hybrid hepatitis B virus core particles carrying circumsporozoite protein epitopes. *J. Exp. Med.* 180, 1037-1046.
- Schwemmle, M., Jehle, C., Shoemaker, T. and Lipkin, W.I. (1999): Characterization of the major nuclear localization signal of the Borna disease virus phosphoprotein. *J. Virol.* 80, 97-100.
- Shah, K.V. (1990): Polyomaviruses. In: *Virology 2nd Edition* (B.N. Fields und D.M. Knipe et al., eds.) Raven Press, New York, pp.1609-1623.

Shoji, I., Aizaki, H., Tani, H., Ishii, K., Chiba, T., Saito, I., Miyamura, T and Matsuura, Y., (1997): Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.* 78, 2657-2664.

Short, N. (1994): The challenge of molecular medicine. *Nature.* 371-373.

Stamatos, N.M., Chakrabarti, S., Moss, B. and Hare, J.D. (1987): Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J. Virol.* 61, 516-525.

Soeda, E., Krauzewicz, N., Cox, C., Stokrova, J., Forstova, J. and Griffin, B.E. (1998): Enhancement by polylysine of transient, but stable expression of genes carried into cells by polyoma VP1 pseudocapsids. *Gene therapy* 5, 1410-1419.

Soussi, T. (1986): DNA-binding properties of the major structural protein of simian virus 40. *J. Virol.* 59, 740-742.

Stehle, T. and Harrison, S. C. (1997): High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16, 5139-5148.

Stokrova, J., Palkova, Z., Fischer, L., Richterova, Z., Korb, J., Griffin, B.E.A and Forstova, J. (1999): Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1. *FEBS Lett.* 445, 119-125.

Strayer, D.S. (1996): SV40 as an effective gene transfer vector in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 24741-24746.

Streuli, C.H. and Griffin, B.E. (1987): Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326, 619-622.

Sutcliffe, J.G. (1979): Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR 322: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90.

- Szomolanyi-Tsuda, E., Le, Q., Garcea, R. L. and Welsh, R. M., (1998): T-cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus like particles. *J. Virol.* 72, 6665-6670.
- Tevethia, M.J., Lacko, H.A. and Conn, A., (1998): Two regions of simian virus 40 large T-antigen independently extend the life span of primary C57BL/6 mouse embryo fibroblasts and cooperate in immortalization. *Virology* 243, 303-312.
- Tooze, J., (1981): Molecular Biology of Tumor Viruses. In: DNA Tumor Viruses, 2nd edition (J. Tooze, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Ulrich, R., Sommerfeld, K., Schröder, A., Prokoph, H., Arnold, W., Krüger, D.H. and Scherneck, S. (1996): Hamster polyomavirus encoded proteins: Gene cloning, heterologous expression and immunoreactivity. *Virus Genes* 12, 265-274.
- Ulrich, R., Nassal, M., Meisel, H. and Krüger, D.H. (1998): Core Particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv. Virus Res.* 50, 141-180.
- Van Regenmortel, M.H.V. (1992): The conformational specificity of viral epitopes. *FEMS Microbiology Letters* 100, 483-488.
- Villarejo, M.R., and Zabin, J. (1974): β -galactosidase from termination and deletion mutants strains. *J. Bacteriol.* 110, 171-178.
- Vogel, F., Zimmermann, W., Krause, H. and Scherneck, S., (1984): Characterization of the DNA of the hamster papovavirus. *Arch. Geschwulstforsch.* 54, 433-441.
- Vogel, F., Rhode, K., Scherneck, S., Bastien, C., Delmas, V. and Feunteun, J. (1986): The hamster papovavirus: Evolutionary relationships with other polyomaviruses. *Virology* 154, 335-343.

- Wagner, R., Deml, L., Fliessbach, H., Wanner, G. and Wolf, H. (1994): Assembly and extracellular release of chimeric Pr55gag retrovirus-like particles. *Virology* 200,162-175.
- Wagner, E., Zatloukal, K., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Curiel, T. D. and Birnstiel, L. M. (1992): Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/ DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 6099-6103.
- Walter, G., Ruediger, R., Slaughter, C. and Mumby, M. (1990): Association of protein phosphatase 2A with polyoma virus middle tumor antigen.*Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 87, 2521-2525.
- Watterson, D.M., Sharief, F.S. and Vanaman, T.C (1980): The complete amino acid sequence of the Ca²⁺-dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255: 961-971.
- Weidt, G., Ufermohlen, O., Zerrahn, J., Reimann, J., Deppert, W. and Lehmann-Grube., F. (1994): CD8+ T lymphocyte-mediated antiviral immunity in mice as a result of injection of recombinant viral proteins. *J. Immunol.* 153, 2554-2561.
- Weiss, S. (1997): A brief review on epitope screening. In: *Immunology Methods Manual* Vol. 2. (Ivan Lefkovits, ed.) Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo und Toronto, pp. 755-780.
- Wickham, J. T., Lee, M.G., Titus, A. J., Sconocchia, G., Bakacs, T., Kovesdi, I. and Segal, M. D. (1997): Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cell via CD3. *J. Virol.* 71, 7663-7669.
- Winston, V.D., Bolen, J.B. and Consigli, R.A., (1980): Isolation and characterization of polyoma uncoating intermediates from the nuclei of infected mouse cells. *J. Virol.* 33, 1173-1181.
- Wychowski, C., Benichou, D. and Girard, M. (1986): A domain of SV 40 capsid polypeptide VP1 that specified migration into the cell nucleus. *EMBO J.* 5, 2569-2576.

- Wychofski, C., Benichou, D. and Girard, M., (1987). The intranuclear location of simian virus 40 polypeptide VP2 and VP3 depends on a specific amino acid sequence. *J. Virol.* 43, 3862-3869.
- Yi, X. and Freund, R. (1998): Deletion of proline-rich domain in polyomavirus T antigens results in virus partially defective in transformation and tumorigenesis. *Virology* 248, 420-431.
- Yuen, L.K.C. and Consigli, R.A (1983) : Generation of capsid from unstable polyoma virions. *J. Virol.* 47, 620-625.
- Zeng, C.Q., Labbe, M., Cohen, J., Prasad, B.V., Chen, D., Ramig, R.F. and Estes, M.K. (1994): Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology* 201, 55-65.
- Zimmermann, W., Krause, H., Scherneck, S., Feunteun, J. and Geissler, E. (1984): Molecular cloning of the hamster papovavirus genome in *E. coli* plasmid vector pBR 322. *Gene* 29, 243-246.

Publikationsliste

Tagungsbeiträge und Vorträge

Voronkova, T., Hassen, S. and Kazaks, A: Generation and use of an *E. coli* expression library for mapping of epitopes in the hamster polyomavirus major capsid protein. Abstr. 9th European students conference of the Charité, Berlin Oktober 1998, V07.

Hassen, S., von Eichhain, M., Özel, M., Voronkova, T., Zocher, R., Jandrig, B., Arnold, W., Schmidt, M.F.G., Scherneck, S., Krüger, D.H. and Ulrich, R: The major capsid protein of the hamster polyomavirus expressed in insect cells forms virus-like particles. Abstr. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg, März 1998, 1P9.

Hassen, S.: The structural proteins of hamster polyomavirus. Abstr. 8th European students conference of the Charité, Berlin, Oktober 1997, B57.

Hassen, S., Voronkova, T., Ulrich, R., Zocher, R., Jandrig, B., Jia, W., Scholz, D., Özel, M., Arnold, W., Prokoph, H., Scherneck, S. and Krüger, D.H. (1997). The structural proteins of hamster polyomavirus. Abstr. XXIIInd European Tumor Virus Group Meeting, Innsbruck/ Igls, Virus Research, 47, 103.

Hassen, S., Voronkova, T., Ulrich, R., Zocher, R., Jandrig, B., Jia, W., Scholz, D., Özel, M., Arnold, W., Prokoph, H., Scherneck, S., Krüger, D.H.: The structural proteins of hamster polyomavirus. Abstr. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hamburg, März 1996, 1P9.

Ulrich, R., Jia, W., Hassen S., Sommerfeld, K., Scholz, D., Prokoph, H., Arnold, W., Krüger, D.H., Scherneck, S.: Hamster Polyomavirus-Proteine: Genklonierung, Expression und Immunreaktivität. Abstr. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Jena, März 1996, P38.

Veröffentlichungen

Hassen, S., Özel, M., von Eichhain, M., Jandrig, B., Arnold, W., Schmidt, M.F.G., Scherneck, S. and Ulrich, R: The major capsid protein of the hamster polyomavirus expressed in insect cells forms virus-like particles. In Vorbereitung.

Hassen, S., Frömmel, C., Voronkova, T., Hahn, S., Arnold, W., Schneider-Mergener, J., Scherneck, S. and Ulrich, R. (1999). The C-terminal region of hamster polyomavirus VP1 bears an immunodominant, crossreactive B-cell epitope. Eingereicht.

Hassen, S., Özel, M., Jandrig, B., Voronkova, T., Jia, W., Zocher, R., Arnold, W., Scherneck, S., Krüger, D.H. and Ulrich, R: (1998) Capsid protein-encoding genes of hamster polyomavirus and properties of the viral capsid. Virus Genes 18, 39-47.

Ulrich, R., Krüger, D.H., Koletzki, D., Lachmann, S., Meisel, H. and Hassen, S. (1998). Neue Strategien der Impfstoffentwicklung: Gentechnische Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln. Humboldt-Spektrum 3, 4-10.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Hassen Siraj Wollebo
Wohnort:	Franz-Mehring-Platz 2/1570
Geburtsdatum:	11. Juni 1969 in Addis Abeba, Äthiopien
Familienstand:	ledig

Schulbildung

September 1974-Juni 1980	Grundschule, African Union Elementary School
September 1980-Juni 1984	Oberschule, Menelik II Comprehensive Secondary School

Studium

September 1985-November 1987	Medizinstudium an der Addis Abeba University
September 1988-Juni 1989	Vorbereitung auf das Hochschulstudium am Herder-Institut der Universität Leipzig
September 1989-Dezember 1994	Direktstudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Fachrichtung Biochemie
Dezember 1994	Abschluß der Diplomarbeit
Juni 1995	Beginn der Dissertation

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Virologie der Charité anfertigen zu können und für die mir gewährte Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Ulrich möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und sehr gute Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. M. F. G. Schmidt, Dr. M. Özel, Dr. R. Zocher und ihren Mitarbeitern, ohne deren Hilfe ich diese Arbeit hätte nicht anfertigen können. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Christina Grübel und Frau PD Dr. Cornelia Schroeder für organisatorische Hilfen und hilfreiche Diskussionen. Für die Überlassung der HaPV-VP1-Klone danke ich Frau Dr. T. Voronkova, für die technische und moralische Unterstützung Frau K. Dauer.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hassen Siraj